



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

JOYCE PELLISSON PEREIRA

**FENÓLICOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE
E ANTIMICROBIANA DE ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE VINHO
PAULISTA ELABORADO COM A VARIEDADE DE UVA MÁXIMO IAC
138-22**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
APRESENTADA À FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNICAMP PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM CIÊNCIA DE
ALIMENTOS.**

**PROF. DR. MARCELO ALEXANDRE PRADO
ORIENTADOR**

**PROFA. DRA. MARTA CRISTINA TEIXEIRA DUARTE
CO-ORIENTADORA**

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Joyce Pellisson Pereira, aprovada pela comissão julgadora em ____/____/____ e orientada pelo Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
CLAUDIA AP. ROMANO DE SOUZA – CRB8/5816 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE
ENGENHARIA DE ALIMENTOS – UNICAMP

P366f Pellisson Pereira, Joyce, 1986-
Fenólicos totais e avaliação das atividades
antioxidante e antimicrobiana de etapas do
processamento do vinho elaborado com a uva Máximo
IAC 138-22 / Joyce Pellisson Pereira. -- Campinas, SP:
[s.n], 2011.

Orientador: Marcelo Alexandre Prado.
Coorientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Compostos fenólicos. 2. Uva - Qualidade. 3.
Atividade antioxidante. 4. Atividade antimicrobiana.
5. Vinho. I. Alexandre Prado, Marcelo. II. Duarte,
Marta Cristina Teixeira. III. Universidade Estadual de
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. IV.
Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Total phenolic and evaluation of antioxidant and antimicrobial
activities of winemaking stages of wine produced with Máximo IAC 138-22
grape

Palavras-chave em inglês (Keywords):

Phenolic compounds

Grape - Quality

Antioxidant activity

Antimicrobial activity

Wine

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Mestre em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marcelo Alexandre Prado [Orientador]

Fabiana Fantinatti Garboggini

Mario Roberto Maróstica Junior

Data da defesa: 26/07/2011

Programa de Pós Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em
____/____/____ por Joyce Pellisson Pereira aprovada pela comissão julgadora em
____/____/____.

Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado
FEA – UNICAMP

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini
Membro titular - CPQBA - UNICAMP

Prof. Dr. Mario Roberto Marostica Junior
Membro titular - DEPAN - FEA - UNICAMP

Profa. Dra. Tais Maria Bauab
Membro suplente - FCFAR - UNESP

Prof. Dr. Flávio Luis Schmidt
Membro suplente - DTA - FEA - UNICAMP

De tudo ficaram três coisas: a certeza de que estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Façamos da interrupção, um novo caminho; da queda, um passo de dança; do medo, uma escada; do sonho, uma ponte e da procura, um encontro.

(FERNANDO SABINO)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Marcelo Alexandre Prado pelo apoio, confiança e orientação neste trabalho e a Prof. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pela co-orientação, dedicação e apoio, que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca pelas correções e sugestões que contribuíram de forma significativa para a versão final desta dissertação.

Agradeço ao Marcos Risso e ao Vitor por gentilmente fornecerem todas as amostras analisadas neste trabalho, pelos vinhos, e pela receptividade e ensinamentos durante a visita que eu e minha família fizemos às cidades de Valinhos e Itatiba.

Agradeço ao Marcio Oliveira e a Éricka Letícia da Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP por toda a ajuda com as análises de atividade antimicrobiana.

Agradeço à Marcela pela ajuda com a análise estatística.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Análise de Alimentos por toda a ajuda, companhia e conversas, em especial a Pollyane, Lucíula, Raquel Grando, Natália, Gabriela e Gislaine. Agradeço ao seu Dirceu, cujo trabalho no laboratório foi essencial para a realização do meu.

Agradeço ao Prof. Dr. Felix Reyes e a todos do Laboratório de Toxicologia pela imensa ajuda com a secagem das amostras no evaporador rotativo: a Silvinha, a Marcela, a Michele, a Juliana e a Raquel. Agradeço especialmente a Luciana, por ter sido muito prestativa, por toda a ajuda e companhia no lab.

Agradeço a todos do Hospital de Clínicas da Unicamp: Bruno, Cecília, Juzinha, Cláudia, Ana Carolina, Gisele, Ana Paula, Zoraida, Michel e Juliana pela amizade,

convivência e apoio. Agradeço ao Dr. Manoel e à Dra Lilian pela oportunidade de trabalhar com pesquisa clínica durante o mestrado e pela compreensão.

Agradeço às amigas de república: Danielle, Ana Luisa, Miriam e Juliana pela amizade, conversas, risadas, companhia e conselhos.

Agradeço a todos os amigos da FEA que fizeram parte destes três anos, pela amizade, baladas, conversas e risadas, especialmente José Valdo, Viviane, Dani Bio e Cristiano e a todos os amigos antigos por continuarem presentes e terem acompanhado todas as dúvidas e certezas destes anos: Thais D., Carolina, Rodrigo, Aline, Tais, Marina, Roberta, Renata, Thais H., Andréa B., Andréa M., Renata S. e Maira.

Agradeço especialmente a minha família pela compreensão, amor e dedicação: a minha mãe Ercy, meu pai Lucio, meu irmão Renato, minha cunhada Camila e meus três sobrinhos Maria Eduarda, Miguel e Davi, pela presença na minha vida.

RESUMO GERAL

A uva Máximo IAC 138-22 apresenta boas características para a produção de vinho com elevado grau Brix. Durante a vinificação, os compostos fenólicos presentes nas uvas são extraídos para o mosto e são de fundamental importância para as características organolépticas do vinho, além de propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, diuréticas, tranquilizantes, antidiabéticas. Dentre estas propriedades, destacam-se a antioxidante e a antimicrobiana, visto que há um interesse emergente no uso de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos visando à preservação de alimentos, além de o seu consumo ser associado à proteção contra doenças severas, que envolvem danos por radicais livres. Além de prevenir a oxidação dos alimentos, os fenólicos poderiam reduzir a deterioração por micro-organismos, visto que apresentam atividade contra bactérias Gram (+), Gram (-) e leveduras. Neste trabalho foram avaliados extratos obtidos em etanol e em acetona de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa e semente, três estágios da vinificação, dois resíduos do processamento do vinho e o vinho artesanal obtido neste processo. Foram avaliados o conteúdo de fenólicos totais, a atividade antioxidante e a concentração mínima inibitória (MIC) dos extratos. Não foi verificada diferença significativa entre as extrações em relação à atividade antioxidante, exceto para a semente e o primeiro resíduo da vinificação. As amostras que apresentaram os maiores teores de fenólicos e também fortes a moderadas atividades antioxidantes definidas pelo AAI foram as sementes (semente em etanol: 136,40 mg de EAG/g de extrato e AAI de 1,717), os resíduos (2º resíduo em acetona: 78,47 mg de EAG/g de extrato e AAI de 0,912) e as cascas (casca em acetona: 58,79 mg de EAG/g de extrato e AAI de 0,546), sugerindo o potencial de reaproveitamento dos resíduos como antioxidantes em substituição

aos sintéticos. Em relação à atividade antimicrobiana, os Gram (+) foram mais sensíveis que os Gram (-). Destaque para a bactéria *B. cereus*, que foi o micro-organismo mais sensível, e para a levedura *C. albicans*, que foi inibida pelos extratos de sementes a baixas concentrações (valores de MIC de 0,001 mg/mL e 0,002 mg/mL). *P. aeruginosa* foi inibida apenas por alguns extratos do processamento do vinho, o que pode estar relacionado à formação de fenólicos durante a vinificação. O vinho apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram (+) e Gram (-) avaliadas e os resíduos da vinificação apresentaram elevados teor de fenólicos e atividade antimicrobiana, com valores de MIC de 1,5 mg/mL a >10 mg/mL), o que sugere a possibilidade de seu reaproveitamento.

Palavras-chave: uva Máximo IAC 138-22, vinho, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Máximo IAC 138-22 grape has good characteristics for production of wine with a high Brix degree. During winemaking, phenolics compounds in grapes are extracted into the must and they are of fundamental importance for organoleptic characteristics of wine, as well as antioxidant, antimicrobial, anticarcinogenic, anti-inflammatory, diuretics, tranquilizers, anti-diabetic properties. Among these properties, antioxidant and antimicrobial are featured, since there is an emerging interest in the use of natural antioxidants to replace synthetic materials in order to preserve food, besides their use is associated with protection against severe disease involving damage by free radicals. In addition to preventing the oxidation of food, phenolics could prevent deterioration by microorganisms, due to their activity against Gram (+), Gram (-) and yeast. In this work, it was evaluated extracts in ethanol and acetone of Máximo IAC 138-22 grape, skin, pulp and seed, three stages of winemaking, two wastes and wine obtained from this process. It was evaluated the total phenolic content, antioxidant activity and the minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts. There was no significant difference between two extractions for most of the samples, except seed and the first waste of winemaking. Samples that showed the highest levels of phenolics and also strong to moderate antioxidant activities, defined by AAI, were seeds (seed in ethanol: 136,40 mg of EAG/g of extract and AAI of 1,717), wastes (2° waste in acetone: 78,47 mg of EAG/g of extract and AAI of 0,912) and skin (skin in acetone: 58,79 mg of EAG/g of extract and AAI of 0,546), suggesting a potential for recycling waste to replace synthetic antioxidants. About antimicrobial activity, Gram (+) were more sensitive than Gram (-). Featured to *B. cereus*, that was the most sensitive microorganism, and yeast *C. albicans*, that was inhibited by seed extracts at low concentrations (MIC values of 0.001 mg/mL and

0.002 mg/mL). *P. aeruginosa* was inhibited only by some extracts from winemaking, which may be related to phenolics compounds produced during this process. Wine showed antimicrobial activity against all Gram (+) and Gram (-) and wastes showed a high phenolic content and antimicrobial activity, with MIC values of 1.5 mg/mL to >10 mg/mL), suggesting the possibility of its reuse.

Key-words: Máximo IAC 138-22 grape, wine, phenolics compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Sumário

INTRODUÇÃO GERAL.....	13
REFERÊNCIAS	15
CAPÍTULO 1	18
FENÓLICOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA EM UVAS E VINHOS – UMA REVISÃO	18
RESUMO.....	19
ABSTRACT.....	20
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
1.1. COMPOSTOS FENÓLICOS	21
1.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	32
1.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	35
2. REFERÊNCIAS	38
CAPÍTULO 2	48
FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO VINHO ELABORADA COM A UVA MÁXIMO IAC 138-22	48
RESUMO.....	49
ABSTRACT.....	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1. AMOSTRAS.....	56
2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E ÁLCOOL DAS AMOSTRAS	58
2.3. EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS	59
2.4. FENÓLICOS TOTAIS	60
2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	61
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4. CONCLUSÃO	73
5. REFERÊNCIAS	74
CAPÍTULO 3	80
FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO VINHO ELABORADO COM A UVA MÁXIMO IAC 138-22	80
RESUMO	81
ABSTRACT	83
1. INTRODUÇÃO	84
2. MATERIAL E MÉTODOS	89
2.1. AMOSTRAS.....	89
2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E ÁLCOOL DAS AMOSTRAS	91
2.3. EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS	92

2.4.	FENÓLICOS TOTAIS	93
2.5.	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	94
2.5.1.	MICRO-ORGANISMOS	94
2.5.2.	MEIOS DE CULTURA	94
2.5.3.	PADRONIZAÇÃO E PREPARO DE INÓCULO.....	94
2.5.4.	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO (CLSI, 2002; CLSI, 2005).....	95
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	95
4.	CONCLUSÃO	109
5.	REFERÊNCIAS	109
	CONCLUSÃO GERAL	116
	PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS	117
	ANEXOS	120

INTRODUÇÃO GERAL

A uva é uma das frutas mais consumidas no mundo, sendo que do total de 1,2 milhão de toneladas produzido no Brasil, por ano, cerca de 45 % é destinado a elaboração de vinhos, sucos e outros derivados e 55 % é comercializado *in natura* (PROTAS, 2008). Em relação à produção de vinhos, sucos e derivados, houve um aumento de 30,40 % em 2007, com destaque para os vinhos de mesa com crescimento de quase 50 % e os vinhos finos de 34,22 % (MELLO, 2008).

Segundo Mello (2002), os vinhos de mesa produzidos no Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo e Minas Gerais possuem um menor valor de mercado. Isso ocorre porque estes vinhos são produzidos com uvas americanas e híbridas, são considerados de menor qualidade e não são produzidos em países tradicionalmente vitícolas.

Diversas pesquisas e políticas públicas nacionais têm sido desenvolvidas para estimular ainda mais o mercado vitivinícola, como a filiação a OIV (Office International de la Vigne e du Vin), o projeto “Indicação Geográfica Vale dos Vinhedos” e o zoneamento vitivinícola, ambos realizados no Rio Grande do Sul, e o programa “Wines From Brazil” para promoção do vinho nacional no exterior (SPVINHO, 2010).

Neste sentido, o governo paulista também está investindo em ações de revitalização da vitivinicultura para a produção de uvas para vinificação e obtenção de vinhos regionais de alta qualidade. Uma das providências tomadas com esse objetivo foi a firmação de um protocolo de intenções pelas instituições estaduais para implantar o “Programa Paulista de Desenvolvimento Vitivinícola – Pró-Vinho”. Neste contexto, está em andamento o projeto

“Revitalização da Cadeia Vitivinícola Paulista: competitividade, governança e sustentabilidade”, parceria entre o Instituto de Economia Agrícola (IEA), o Instituto Agrônômico de Campinas (IAC), a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), o Instituto de Tecnologia de Alimentos (ITAL) e a Fundação SPVINHO (VERDI et al., 2007).

Assim, faz-se necessária uma análise dos vinhos produzidos no Estado de São Paulo, que são elaborados a partir de variedades americanas e híbridas e consumidos por grande parte da população do Estado. Esses vinhos geralmente não são considerados de boa qualidade por apresentarem elevada acidez e baixo teor de açúcar, fazendo-se necessária a chaptalização, ou seja, adição de açúcar ao mosto (JACKSON, 1994). Entretanto, outros fatores podem agregar valor a este produto, como o conteúdo fenólico e as atividades biológicas que estes compostos podem desempenhar.

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e que desempenham funções no crescimento, desenvolvimento e defesa do vegetal. Estes compostos estão presentes em grandes quantidades em vinhos, advindos da casca, polpa e semente das uvas, do metabolismo dos micro-organismos da fermentação e da madeira dos tonéis durante o envelhecimento. Os compostos fenólicos são responsáveis por diversas atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatórias, entre outras (XIA et al., 2010; GHARRAS, 2009; CUSHNIE e LAMB, 2005; JACKSON, 1994).

Estes compostos também estão presentes em grandes quantidades nos resíduos do processamento de vinhos, já que não são totalmente extraídos para o mosto, e podem ser reaproveitados como fonte natural de antioxidantes na indústria de alimentos, em

substituição aos compostos sintéticos (LAFKA et al., 2007; ARVANITOYANNIS et al., 2006).

Entre as variedades de uva utilizadas no Estado de São Paulo para a produção de vinhos, destaca-se a uva Máximo IAC 138-22, que apresenta boa resistência a rachamentos e podridões e possui teores médios de açúcar de cerca de 150 g/L, com um rendimento de até 60 % em vinho (SANTOS NETO et al., 1968 apud TERRA et al., 1990).

Diante disso, este trabalho teve como objetivo quantificar os fenólicos totais e determinar as atividades antioxidante e antimicrobiana da uva Máximo IAC 138-22, de etapas da vinificação, dos resíduos deste processamento e do vinho Máximo artesanal. Estes conhecimentos são úteis para os consumidores que buscam os benefícios do vinho para a saúde e para os produtores que procuram agregar valor de mercado a seus produtos, além de permitir a avaliação dos resíduos visando o seu reaproveitamento.

REFERÊNCIAS

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a Review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475–487, 2006.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Review Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2512–2518, 2009.

JACKSON, R. S. **Wine science - Principles, practice, perception**. Second edition. Academic Press: California, USA, 1994. 648 p.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206–1214, 2007.

MELLO, L. M. R. de. **Tendência de consumo e perspectivas: mercado de vinhos no Brasil**. Embrapa Uva e Vinho, 2002. Disponível em <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>> Acesso em: 20 de agosto de 2008.

MELLO, L. M. R. de. **Vinicultura brasileira: panorama 2007**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2008. Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/artigos/>>. Acesso em: 25 de agosto de 2008.

PROTAS, J. F. S. A produção de vinhos finos: um flash do desafio brasileiro. **Agropecuária Catarinense**, v. 21, n. 1, 2008.

SPVINHO. Panorama da Vitivinicultura Brasileira. Disponível em: <www.spvinho.com.br> Acesso em 01 de agosto de 2008.

TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; PETTINELLI JR., A.; POMMER, C. V.; SABINO, J. C.; PASSOS, I. R. S.; COELHO, S. M. B. M.; SILVA, A. C. P da; RIBEIRO, J. A. Produtividade de cultivares IAC de uvas para vinho como produtores diretos e sobre diferentes porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 345-362, 1990.

VERDI, A. R.; OJIMA, A. L. R. O.; FRANCISCO, V. L. F. S.; SILVA, P. R. **Revitalização da cadeia vitivinícola paulista**. 2007. Disponível em: <<http://www.spvinhos.com.br>> Acesso em 02 de agosto de 2008.

XIA, E.; DENG, G.; GUO, Y.; LI, H. Review: Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 622-646, 2010.

CAPÍTULO 1

FENÓLICOS TOTAIS E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA EM UVAS E VINHOS – UMA REVISÃO

Joyce Pellisson Pereira¹, Marcelo Alexandre Prado¹, Marta Cristina Teixeira Duarte²

¹Laboratório de Análises de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

²Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

RESUMO

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos em vegetais e são divididos em flavonóides e não flavonóides. Os flavonóides podem ser divididos em seis subclasses: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis. Entre os não flavonóides, há os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos e outros derivados como os estilbenos. Estes compostos estão presentes em elevadas quantidades em sementes e cascas de uvas, nos vinhos, além dos resíduos de vinificação, que podem ser reaproveitados. Nos vinhos, os compostos fenólicos são algumas das substâncias responsáveis pela cor, adstringência e amargor, além de benefícios à saúde humana, como a redução de riscos cardiovasculares. Dentre estas propriedades, destacam-se a antioxidante e a antimicrobiana. Há um interesse emergente no uso de antioxidantes naturais em substituição aos sintéticos visando à preservação de alimentos, além do seu consumo ser associado à proteção contra doenças severas, que envolvem em sua maioria danos por radicais livres. Além de prevenir a oxidação dos alimentos, os fenólicos poderiam prevenir a deterioração por micro-organismos, visto que apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram (+), Gram (-) e leveduras.

Palavras-chave: compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, uva, vinho.

ABSTRACT

Phenolics compounds are secondary metabolites widely distributed in plants and are divided into flavonoids and non-flavonoids. Flavonoids can be divided into six subclasses: flavonols, flavones, isoflavones, flavanones, anthocyanidins and flavanols. Among non-flavonoids, there are phenolics, benzoic and cinnamic acids and other derivatives such as stilbenes. These compounds are present in high amounts in seeds and grape skins, wines, besides the waste of winemaking, which can be reused. In wines, phenolics compounds are some of substances responsible for color, astringency and bitterness, as well benefits of human health, like reduction of cardiovascular risks. Among these properties, we highlight antioxidant and antimicrobial activities. There is an emerging interest in use of natural antioxidants instead of synthetic materials in order to preserve food, besides their use is associated with protection against severe disease, mostly involving damage by free radicals. In addition to preventing the oxidation of food, phenolics could prevent spoilage by microorganisms, since they exhibit antimicrobial activity against Gram (+), Gram (-) and yeast.

Key-words: phenolics compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, grape, wine.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuídos em vegetais e cujas estruturas variam de simples moléculas (ácidos fenólicos, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos), sendo os flavonóides o grupo mais comum e largamente distribuído entre eles (BRAVO, 1998).

Com o esmagamento das uvas, compostos fenólicos de diferentes partes da fruta são transferidos para o mosto. Da polpa tem-se: ácidos hidroxicinamoil tartáricos (HCTA), ácidos fenólicos e aldeídos; da casca: HCTA, ácidos fenólicos, antocianinas, provanidinas e proantocianidinas e flavonóis; e das sementes: taninos, provanidinas e proantocianidinas, ácido gálico, catequina e epicatequina. Estas estruturas podem polimerizar e condensar durante o processamento e envelhecimento do vinho e produzir novas estruturas. Os compostos fenólicos desempenham uma importante função nas características organolépticas do vinho. Em particular, os taninos conferem adstringência e estrutura para a formação de complexos com as proteínas da saliva (FLAMINI, 2003).

Os compostos fenólicos podem ser divididos em dois grupos: os flavonóides (Figura 1) e os não flavonóides. Os flavonóides representam o maior grupo de polifenóis encontrados em alimentos (SCALBERT e WILLIANS, 2000), além de serem considerados os mais potentes antioxidantes entre os compostos fenólicos (SHAHID et al., 1992; SOOBRAATTEE et al., 2005).

Os flavonóides são moléculas com uma estrutura de dois anéis fenólicos e um heterociclo oxigenado que ocorrem em plantas, onde estão presentes predominantemente

como glicosídeos. Podem ser divididos em seis subclasses pela função e o tipo de heterociclo envolvido: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas, antocianidinas e flavanóis (SHI et al., 2003). Também são responsáveis pelas cores de flores, frutos e folhas, além da atividade de regulação do desenvolvimento vegetal, como moduladores do transporte polar da auxina (BUER e MUDAY, 2004).

Nas plantas, os flavonóides fornecem as cores responsáveis por atrair agentes polinizadores. Nas folhas, estes compostos possuem atividade fisiológica na proteção contra patógenos e radiação ultravioleta B (UVB). Além disso, estão envolvidos na transferência de energia, no controle da respiração e fotossíntese, nos hormônios de crescimento e na determinação de caráter morfológico e sexual de vegetais (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Em vinhos, os flavonóides mais comuns são os flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina) e os flavanóis (catequina, epicatequina, galocatequina, procianidinas e taninos condensados). As antocianinas (cianina e malvidina-3-glicosídeo) estão presentes especialmente em vinhos tintos, onde os flavonóides constituem mais de 85 % dos fenólicos totais (≥ 1000 mg/L), sendo que nos brancos esta porcentagem não chega a 20 % (≤ 50 mg/L) (JACKSON, 1994).

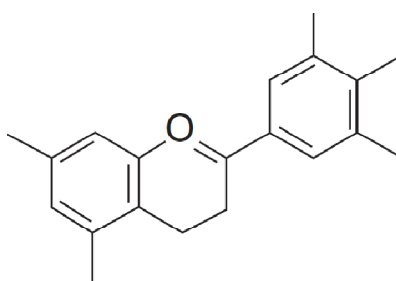


Figura 1: Estrutura de flavonóides (GHARRAS, 2009)

Os flavonóis (Figura 2) são representados principalmente pelos compostos kaempferol e quercitina, sendo este último considerado um potente antioxidante devido à estrutura disponível para a atividade sequestradora de radicais livres. Estes compostos estão presentes geralmente em baixas concentrações em alimentos (15 a 30 mg/kg de matéria fresca), geralmente em formas glicosiladas, sendo a maioria dos açúcares glicose e rhamnose, mas outros podem estar envolvidos, como galactose, arabinose, xilose e ácido glucurônico (GHARRAS 2009). Ademais, protegem as células vegetais dos danos causados por fotoxidação, além de ser um atrativo para insetos como abelhas, que enxergam na faixa extrema do ultravioleta (FERREIRA et al., 2008).

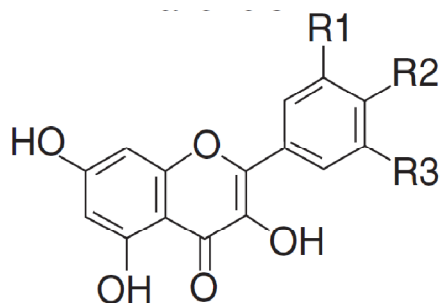


Figura 2: Estrutura de flavonóis (GHARRAS, 2009)

As flavonas (Figura 3) são menos comuns em frutos e vegetais que os flavonóis e são constituídas principalmente de glicosídeos de luteolina e apigenina. Estes flavonóides absorvem na faixa do ultra-violeta, repelindo todo o restante do espectro da luz solar, resultando, em algumas flores, a coloração branca e em outras amarela (FERREIRA et al., 2008). Ainda, as flavonas secretadas no solo pelas raízes das leguminosas atuam como

mediadores na interação das plantas com os micro-organismos simbiotes fixadores de nitrogênio (THEUNIS et al., 2004).

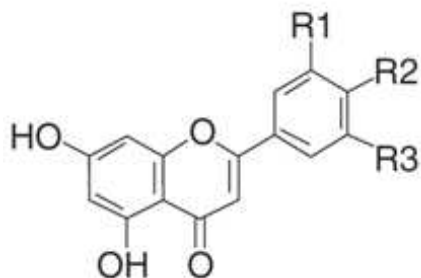


Figura 3: Estrutura de flavonas (GHARRAS, 2009)

As flavanonas (Figura 4) estão presentes em tomates e algumas plantas aromáticas, como a hortelã, mas elevadas concentrações podem ser observadas em frutas cítricas. Os alimentos raramente contêm quantidades significantes de flavanonas agliconas, visto que estes compostos são geralmente glicosilados por um dissacarídeo na posição sete (MANACH et al., 2005).

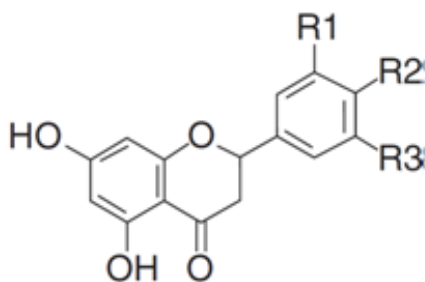


Figura 4: Estrutura de flavanonas (GHARRAS, 2009)

As isoflavonas (Figura 5) estão presentes em produtos derivados de soja e podem estar presentes como agliconas ou glicosídeos, dependendo do tipo de processamento a qual o produto foi submetido. Segundo Gharras (2009), a soja e seus produtos processados são as maiores fontes de isoflavonas da dieta humana e os teores destes fenólicos dependem das condições de cultivo e processamento.

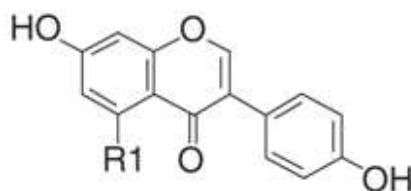


Figura 5: Estrutura de isoflavonas (GHARRAS, 2009)

Os flavanóis (Figura 6) existem tanto na forma monomérica (catequinas), quanto na forma de polímeros (proantocianidinas). As catequinas são encontradas em frutas, vinho tinto (em concentrações superiores a 300 mg/L), chás verdes e chocolates. A catequina e a epicatequina são os principais flavanóis em frutas, enquanto que a galocatequina, epigalocatequina e galato de epigalocatequina são encontrados em algumas sementes de leguminosas, uvas e chás (GHARRAS, 2009).

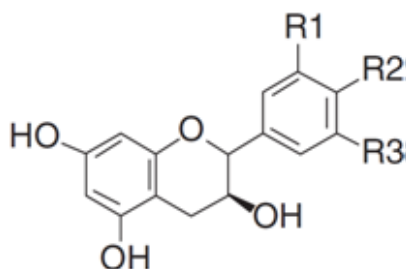


Figura 6: Estrutura de flavanóis (GHARRAS, 2009)

As proantocianidinas (Figura 7), também conhecidas como taninos condensados, são dímeros, oligômeros e polímeros de catequinas ligados entre os carbonos 4 e 8, ou ainda 6. As proantocianidinas são os fenólicos presentes em maiores concentrações nas uvas, localizados principalmente em cascas e sementes. Estes compostos formam complexos com a saliva e são responsáveis pela adstringência de frutas como maçã e pêra, de bebidas como vinho, chá e cerveja e pelo amargor do chocolate. Essa adstringência é alterada durante a maturação dos frutos e desaparece no fruto maduro (GHARRAS, 2009).

As antocianinas são extraídas das cascas das uvas durante a fermentação e são os principais componentes responsáveis pela coloração do vinho tinto, variando durante a maturação e também com o envelhecimento do vinho devido às interações entre as antocianinas e outros compostos coloridos, incluindo (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina, kaempferol e ácidos fenólicos (MAZZA et al., 1999).

O perfil de antocianinas é útil para caracterizar e determinar a origem dos produtos e identificar possíveis adulterações em vinhos. Em países onde é proibida a comercialização de vinhos não produzidos com a variedade *Vitis vinifera*, avalia-se a presença de antocianina 3,5-O-diglicosídeo, que é praticamente ausente nesta variedade. Ademais, o

conhecimento sobre os taninos é importante para prever as características de envelhecimento do vinho e para tentar resolver problemas relacionados à estabilidade da cor, especialmente dos vinhos com longos períodos de envelhecimento (FLAMINI, 2003).

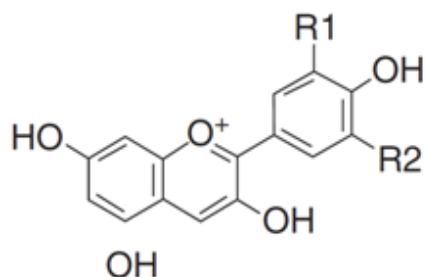


Figura 7: Estrutura de antocianidinas (GHARRAS, 2009)

Entre os não flavonóides, estão os ácidos fenólicos, benzóicos e cinâmicos e outros derivados como os estilbenos. Os derivados de ácidos benzóicos são constituídos pelos ácidos vanílico, sirínico e salicílico, ligados às paredes celulares, e, principalmente, o ácido gálico, que se encontra sob a forma de éster de flavanóis. Este ácido apresenta elevada absorção, quando comparado a outros polifenóis, além de considerável atividade antioxidante. Os ácidos hidroxibenzoicos (Figura 8) são componentes de uma complexa estrutura como taninos hidrolisáveis e sua distribuição em alimentos é limitada (GHARRAS, 2009).

Entre os derivados de ácido cinâmico (Figura 9) encontram-se o ácido ferrúlico, o p-cumárico e o ácido caféico. Estes compostos são mais comuns que os ácidos hidroxibenzoicos, entretanto, são raramente encontrados na forma livre, exceto em alimentos que sofreram congelamento, esterilização ou fermentação. As formas ligadas são

derivados glicosilados ou ésteres de ácido quínico, ácido chiquímico e ácido tartárico. Ácido quínico e caféico se combinam para formar ácido clorogênico, que é encontrado em muitos tipos de frutas e em altas concentrações no café. O ácido caféico, livre ou esterificado, é geralmente o mais abundante entre os ácidos fenólicos e representa entre 75 % e 100 % do total de ácido hidroxicinâmico da maioria das frutas. Os ácidos hidroxicinâmicos são encontrados em todas as partes da fruta, embora as maiores concentrações sejam verificadas na parte externa do fruto maduro. A concentração destes compostos geralmente diminui com o amadurecimento dos frutos, mas quantidades totais aumentam com o aumento no tamanho dos frutos (GHARRAS, 2009).

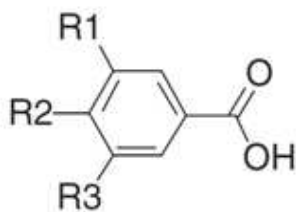


Figura 8: Ácidos hidroxibenzóicos
(GHARRAS, 2009)

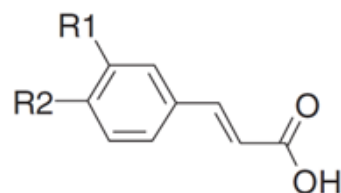


Figura 9: ácidos hidroxicinâmicos
(GHARRAS, 2009)

Os estilbenos são encontrados apenas em pequenas quantidades na dieta humana. Entre eles, destaca-se o resveratrol (Figura 10), que possui atividades anticarcinogênicas e anti-inflamatórias e efeitos em ateroscleroses (SOVAK, 2001). Segundo Gharras (2009), o resveratrol é encontrado em pequenas quantidades em vinhos tintos: 0,3-7 mg/L agliconas e 15 mg/L glicosídeos.

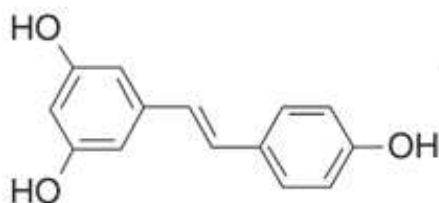


Figura 10: Resveratrol (GHARRAS, 2009)

Os ácidos fenólicos estão localizados, principalmente, nas cascas das uvas (JACKSON, 1994). O contato da casca com o mosto durante a vinificação, a temperatura do processamento, a presença das sementes, do engace e das enzimas influenciam na extração dos fenólicos da amostra (KOVAC et al., 1992).

Nos vinhos, os compostos fenólicos são algumas das substâncias responsáveis pela cor, adstringência e amargor. Durante a maceração, etapa fundamental para a qualidade aromática desta bebida, estes metabólitos secundários são transferidos da uva para o mosto. Como durante a fermentação do vinho branco as cascas e as sementes são retiradas logo no início do processo, estas substâncias encontram-se em menor concentração quando comparadas com o vinho tinto (MARGALIT, 2004). Segundo Jackson (1994), outras fontes de fenólicos são o metabolismo das leveduras e das bactérias lácticas e a madeira dos tonéis.

A composição de flavonóides de cascas e sementes de uva difere não apenas quantitativamente, mas também de forma qualitativa. Assim, durante a fermentação, a maioria dos flavonóides é liberada das cascas, e os vinhos que apresentam baixas quantidades desses compostos são resultantes de períodos curtos de maceração. Após a fermentação, ocorre a difusão de flavanóis das sementes e, desta forma, vinhos com altas

concentrações destes compostos são obtidos após longos períodos de maceração em contato com as sementes. Isto pode ser verificado em uma solução alcoólica contendo sementes de uva, em que há um aumento progressivo do conteúdo fenólico após o terceiro dia de contato e um aumento de quase 90 % após três semanas (LOMOLINO et al., 2010).

A presença de flavanóis em vinhos é de grande importância para o perfil organoléptico. Uma grande concentração de polifenóis resulta em características organolépticas (adstringência a amargor), enquanto que altos níveis de flavanóis, especialmente monômeros e dímeros, representam uma boa fonte de antioxidantes. A concentração de catequina no vinho depende da variedade de uva, visto que algumas apresentam altas concentrações do seu isômero epicatequina (LOMOLINO et al., 2010).

Além de fornecerem características sensoriais ao vinho, os compostos fenólicos são responsáveis por propriedades antioxidantes, antimicrobianas, anticarcinogênicas, anti-inflamatórias, diuréticas, tranquilizantes, antidiabéticas, entre outras (JACOB et al., 2008; JACKSON, 1994). Na França, a baixa incidência de aterosclerose e de distúrbios coronários tem sido associada ao consumo regular de vinho pela população, em contraste com outros países europeus de semelhante dieta, sendo este fenômeno conhecido como “paradoxo francês” (DIXON et al., 2002; ESTRUCH, 2000; SHRIKHANDE, 2000; MAR e ZEISEL, 1999).

Segundo Anastasiad et al. (2010), os compostos fenólicos são responsáveis por vários benefícios à saúde devido as suas propriedades antioxidantes, visto que podem agir na captura de radicais livres, como doadores de elétrons e hidrogênio, e quelantes de metal, prevenindo a peroxidação de lipídios e danos ao DNA. Ainda, protegem as células de danos

oxidativos e, assim, limitam o risco de desenvolvimento de doenças degenerativas associadas ao estresse oxidativo, como a doença de Alzheimer.

Como a composição fenólica, responsável pela qualidade sensorial e pelos benefícios à saúde dos consumidores, depende, entre outros fatores, da variedade da uva e varia durante o processamento, é interessante avaliar o teor destes compostos em diferentes variedades, além do mosto, no vinho e nos resíduos gerados neste processo. Essa análise de fenólicos totais pode ser realizada por métodos colorimétricos e enzimáticos (BEER et al., 2003; WALKER et al., 2003). Grande parte dos trabalhos determina o teor de fenólicos em vinhos por métodos colorimétricos com o reagente Folin-Ciocalteu, sendo o resultado expresso em equivalente de ácido gálico (BREKSA et al., 2010; LUCENA et al., 2010; KATALINIĆ et al., 2010; VAQUERO et al., 2007a; VAQUERO et al., 2007b; ABE et al., 2007; PAIXÃO et al., 2007; BRAVO et al., 2006; FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004). Além destes métodos, a determinação da composição fenólica em produtos naturais pode ser feita por técnicas cromatográficas, que permitem a identificação e a quantificação dos compostos fenólicos (STALIKAS, 2007).

Segundo Lomolino et al. (2010), os vinhos de uma determinada região são considerados uma expressão do território, visto que são resultados de uma cultura, solo e clima locais, características originais, típicas e únicas. Diante disso, surge um grande interesse por estudos dessa biodiversidade de videiras, visando o desenvolvimento e melhoria da qualidade destes vinhos.

1.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Há um interesse emergente no uso de antioxidantes naturais visando à preservação de alimentos e a proteção contra doenças severas, que envolvem em sua maioria danos por radicais livres. Estes compostos podem ter um efeito benéfico como agentes profiláticos e há uma inversão associada ao consumo de vegetais, frutas e vinho e o risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Embora os efeitos protetores sejam atribuídos a antioxidantes, como vitamina C, vitamina E e β -carotenos, outros fenólicos de plantas também podem apresentar esta importante função. Além disso, restrições quanto ao uso de antioxidantes sintéticos como butil-hidroxianisol (BHA) e butil-hidroxitolueno (BHT) em alimentos reforçam o conceito do uso de compostos naturais com tais propriedades (HIDALGO et al., 2010; XIA et al., 2010; GHARRAS, 2009).

Neste contexto, materiais derivados de plantas têm sido avaliados como fontes de antioxidantes ativos. Biomassa residual de atividades industriais e da agricultura são matérias primas favoráveis para o processamento químico devido ao baixo custo e a possibilidade de evitar problemas ambientais causados por sua eliminação. Dentre estes resíduos, os subprodutos derivados de uvas e vinhos apresentam elevado conteúdo fenólico, o que poderia ser associado a uma separação seletiva e recuperação de compostos naturais com atividade antioxidante (AMENDOLA et al., 2010; LAFKA et al., 2007; ARVANITOYANNIS et al., 2006; CRUZ et al., 2004).

De acordo com Bianchi e Antunes (1999), os antioxidantes impedem a formação dos radicais livres; interceptam estes compostos gerados pelo metabolismo celular ou por

fontes exógenas, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular; e reconstituem as membranas celulares já danificadas.

Xia et al. (2010) relatam que a capacidade antioxidante dos fenólicos está relacionada a um limite de concentração e que acima deste limite a atividade não é aumentada proporcionalmente. Entretanto, além da concentração de fenólicos, outros fatores afetam a atividade antioxidante, como a presença de antocianinas, além do efeito sinérgico dos compostos.

Ademais, o grupo químico funcional e estrutura para compostos com atividade antioxidante é o OH. O número e a posição deste grupo no anel determina a capacidade de flavonóis. A adição de um grupo OH no núcleo do flavonóide aumenta essa capacidade, enquanto que sua substituição por grupo OCH₃ a diminui (XIA et al., 2010).

A capacidade antioxidante pode ser determinada por diversos métodos espectrofotométricos *in vitro*. Dentre eles, alguns são baseados na captura de radicais livres, como o ORAC (“oxygen radical absorbance capacity”), o ABTS (2,2’-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), outros no poder de redução do metal, como o FRAP (“ferric reducing antioxidant power”) ou na quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios, como o TBARS (ácido tiobarbitúrico) e a oxidação do LDL (lipoproteína de baixa densidade) (ANTOLOVICH et al., 2002; SANCHÉS-MORENO et al., 1999; PAIXÃO et al., 2007).

A atividade antioxidante de uvas, vinhos e resíduos pode ser avaliada de maneira eficiente pelo método do DPPH• (CATANEO et al., 2008; FERNÁNDEZ-PACHÓN et al., 2004; BARTOLOMÉ et al., 2004; BEER et al., 2003). Este método consiste na redução do radical DPPH• quando este entra em contato com um composto capaz de doar um elétron

ou átomo de hidrogênio, alterando a cor da solução metanólica de DPPH• de violeta para amarelo (SCHERER e GODOY, 2009; MILARDOVIĆ et al., 2006). A adição do antioxidante resulta em um decréscimo na absorbância proporcional a concentração e atividade antioxidante do composto (PAIXÃO et al., 2007). Este método é um dos mais utilizados por ser considerado simples e rápido (ANTOLOVICH et al., 2002; BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A molécula de DPPH• é caracterizada como um radical livre em virtude da deslocalização de um elétron pela molécula como um todo, o que faz com que a molécula não forme um dímero, como ocorre com a maioria dos radicais livres. Quando uma solução de DPPH é misturada a uma substância que pode doar um átomo de hidrogênio, há a formação da forma reduzida (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Um dos parâmetros utilizados para a interpretação dos resultados do método de DPPH é a “concentração eficiente” ou valor de IC₅₀. Esta é definida como a concentração do substrato que promove a redução de 50 % da atividade do DPPH (SCHERER e GODOY, 2009; MILARDOVIĆ et al., 2006).

Muitos estudos analisam a relação entre a capacidade antioxidante e o conteúdo de fenólicos totais de uvas e vinhos. Paixão et al. (2007) verificaram que vinhos tintos têm maior quantidade de fenólicos totais e maior ação antioxidante *in vitro* que vinhos rosé e branco. Soares et al. (2008) avaliaram cascas de uva Niágara e Isabel e concluíram que a capacidade antioxidante está relacionada ao conteúdo de polifenóis totais e antocianinas.

Essa relação também foi estudada em resíduos da produção de vinho e concluiu-se que estes apresentam níveis de compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante significativos (CATANEO et al., 2008). Estes resíduos contêm substâncias que não foram totalmente extraídas durante o processamento e que são de grande importância para a

indústria alimentícia, podendo ser reaproveitados como fonte natural de antioxidantes (LAFKA et al., 2007).

1.3. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os micro-organismos apresentam efeitos desfavoráveis na qualidade, segurança e tempo de prateleira de alimentos. O uso de aditivos sintéticos é um dos procedimentos adotados para prevenir este problema. Recentemente, há um interesse crescente na aplicação de extratos vegetais para prevenir esta deterioração ao invés de compostos sintéticos (BAYDAR et al., 2004).

Os compostos fenólicos presentes em extratos vegetais podem afetar o crescimento e metabolismo dos micro-organismos (DIXON e STEELE, 1999). Isto porque os flavonóides inibem a síntese de ácidos nucleicos, a função das membranas citoplasmáticas e a energia do metabolismo dos micro-organismos (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Devido à generalizada habilidade dos flavonóides em inibir a esporulação de patógenos de plantas, tem sido proposta sua utilização contra fungos patógenos humanos (CUSHNIE e LAMB, 2005). A atividade antibacteriana de extratos de uva e seus derivados tem sido constantemente documentada (BROWN et al., 2010; YIM et al., 2010; CORRALES et al., 2009; FURIGA et al., 2009; RHODES et al., 2006; BAYDAR et al., 2004). Exemplos de flavonóides detectados com atividade antibacteriana são quercetina, kaempferol, flavonas, glicosídeos de flavonas, isoflavonas, flavanonas, isoflavanonas, isoflavanas, flavonóis e glicosídeos de flavonol (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Diversos métodos são utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana, como a técnica de difusão em ágar, difusão em discos de papel, técnica de macrodiluição e de microdiluição (LIU et al., 2007; CLSI, 2002; CLSI, 2003; CLSI, 2005; CUSHNIE e LAMB, 2005).

A atividade antimicrobiana de extratos fenólicos pode ser avaliada *in vitro* principalmente pelos métodos de difusão em placa e de diluição em caldo. Os testes são feitos em placas com meio ágar ou caldo, onde são acrescentadas diversas concentrações dos extratos e inoculado o micro-organismo de interesse (CLSI, 2002; CLSI, 2005).

Em particular, métodos de difusão de flavonóides podem não quantificar com precisão a atividade antimicrobiana, visto que flavonóides com atividade podem ter uma baixa taxa de difusão. Além disso, outros fatores podem ser os responsáveis pela obtenção de resultados discrepantes, como a quantidade de inóculo. Segundo o CLSI (2002, 2005), a quantidade de inóculo é considerada a variável mais suscetível nestes testes. Outros fatores como a quantidade e tipo de meio ou agar, tamanho dos poços, tamanho dos discos de papel, cepas de bactérias utilizadas e período de incubação são determinantes e explicam as variações de resultados. Em métodos de determinação da concentração inibitória mínima, a precipitação de flavonóides diminui o contato entre os micro-organismos e o substrato e pode promover resultado falso negativo, além de poder ser interpretada como um crescimento bacteriano (CUSHNIE e LAMB, 2005).

A capacidade antimicrobiana de um agente pode ser determinada pelo tamanho do halo de inibição formado ao redor de discos de papel com extratos fenólicos depositados sobre o meio ágar (BAYDAR et al., 2004); ou ainda pela concentração mínima de extrato fenólico que impede o crescimento visível do micro-organismo (“minimal inhibitory

concentration”, MIC). Neste último caso, quando se utiliza meio caldo, são adicionados reveladores, que indicam pela coloração se houve ou não inibição do crescimento do micro-organismo (DUARTE et al., 2007).

Estas metodologias são utilizadas em trabalhos que comprovam o efeito antimicrobiano de extratos fenólicos de uvas e de resíduos do processamento de vinhos diante de contaminantes de alimentos (CARNEIRO et al., 2008; VAQUERO et al., 2007a; VAQUERO et al., 2007b; RHODES et al., 2006; ÖZKAN et al., 2003). Segundo Papadopoulou et al. (2005), esta atividade também foi obtida por certos vinhos, que se mostraram efetivos contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

Alta atividade antibacteriana *in vitro* contra cepas de *S. aureus* e *E. coli* e baixa atividade contra cepas de *Salmonella sp.* de extratos de semente de uva desengordurada foram verificadas por Rotava et al. (2009).

In vivo, o consumo de vinhos pode ser eficiente contra *Campylobacter jejuni* (CARNEIRO et al., 2008), *Listeria innocua* (FERNANDES et al., 2007), bactérias Gram (+), Gram (-) e leveduras, diminuindo significativamente o número de patógenos no trato digestivo e, conseqüentemente, o risco de infecções gastrointestinais (PAPADOPOULOU et al., 2005).

Além de atribuir a atividade antimicrobiana de vinhos aos compostos fenólicos, alguns trabalhos sugerem que este pode estar relacionado à ação sinérgica entre os ácidos orgânicos e o etanol (CARNEIRO et al., 2008), ou ainda à interação dos seguintes fatores: pH ácido entre 3,0 e 4,0, presença de ácidos orgânicos, teor alcoólico e quantidades totais de dióxido sulfúrico (WAITE e DAESCHEL, 2007).

A atividade antimicrobiana e a estrutura dos compostos têm sido relacionadas. Os grupos 3,4,5-trihidroxifenil encontrados em epigallocatequina, epigallocatequina-3-O-galato, entre outros, podem ser importantes para a atividade antibacteriana. Isto indica que o número de hidroxilas e o grau de polimerização podem ser essenciais para a atividade antimicrobiana de compostos fenólicos (CUSHNIE e LAMB, 2005).

Assim, a avaliação da presença de compostos fenólicos com atividades antioxidante e antimicrobiana em uvas e vinhos é importante devido aos benefícios para a saúde que seu consumo pode trazer. Ainda, o isolamento destes compostos de resíduos da vinificação ou a utilização de matéria bruta podem ser úteis na indústria de alimentos, substituindo compostos sintéticos utilizados para evitar a deterioração de alimentos, além de ser uma alternativa para o descarte destes materiais orgânicos.

2. REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V. da; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

AMENDOLA, D.; FAVERI, D. M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384–392, 2010.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A.; HAROUTOUNIAN, S. A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines

and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, p. 805–813, 2010.

ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **Analyst**, v. 127, p. 183–198, 2002.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a Review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475–487, 2006.

BARTOLOMÉ, B.; NUNEZ, V.; MONAGAS, M.; GOMEZ-CORDOVES, C. *In vitro* antioxidant activity of red grape skins. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 173–177, 2004.

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G. B.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335–339, 2004.

BEER, D.; JOUBERT, E.; GELDERBLOM, W. C. A.; MANLEY, M. Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: free radical scavenging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 902-909, 2003.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; BOAS, L. V.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**, v. 563, p. 84-92, 2006.

BREKSA, A. P.; TAKEOKA, G. R.; HIDALGO, M. B.; VILCHES, A.; VASSE, J.; RAMMING, D. W. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. **Food Chemistry**, v. 121, p. 740–745, 2010.

BROWN, J. C.; WANG, J.; KASMAN, L.; JIANG, X.; HALEY-ZITLIN, V. Activities of muscadine grape skin and quercetin against *Helicobacter pylori* infection in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 139–146, 2010.

BUER, C. S.; MUDAY, G. K. The transparent testa4 mutation prevents flavonoid synthesis and alters auxin transport and the response of Arabidopsis roots to gravity and light. **Plant Cell**, v. 16, p. 1191-1205, 2004.

CARNEIRO, A.; COUTO, J. A.; MENA, C.; QUEIROZ, J.; HOGG, T. Activity of wine against *Campylobacter jejuni*. **Food Control**, v. 19, p. 800–805, 2008.

CATANEO, C. B.; CALIARI, V.; GONZAGA, L. V.; KUSKOSKI, E. M.; FETT, R. Atividade antioxidante e conteúdo fenólico do resíduo agroindustrial da produção de vinho. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 93-102, 2008.

CLSI (2002). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica – 2ª Edição, M27-A2, v. 22, n. 15.

CLSI (2003). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão – 8ª Edição, M2-A8, v. 23, n. 1.

CLSI (2005). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico – 6ª Edição, M7-A6, v. 23, n. 2.

CORRALES, M.; HAN, J. H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 425–433, 2009.

CRUZ, J. M.; DOMIÄNGUEZ, H.; PARAJOÄ, J. C. Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5612-5620, 2004.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Review Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

DIXON, J. B.; DIXON, M. E.; O'BRIEN, P. E. Reduced plasma homocysteine in obese red wine consumers: a potential contributor to reduced cardiovascular risk status. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 608–614, 2002.

DIXON, R. A.; STEELE, C. L. Flavonoids and isoflavonoids – a gold mine for metabolic engineering. **Trends in plant science reviews**, v. 4, n. 10, 1999.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 197–201, 2007.

ESTRUCH, R. Wine and cardiovascular disease. **Food Research International**, v. 33, p. 219-226, 2000.

FERNANDES, J.; GOMES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. **Food Control**, v. 18, p. 1477–1483, 2007.

FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; VILLAÑO, D.; GARCÍA-PARRILLA, M.C.; TRONCOSO, A.M. Antioxidant activity of wines and relation with their polyphenolic composition. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, p. 113–118, 2004.

FERREIRA, M. M. M.; OLIVEIRA, A. H. C. de; SANTOS, N. S. dos. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 57-60, 2008.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p. 218– 250, 2003.

FURIGA, A.; LONVAUD-FUNEL, A.; BADET, C. In vitro study of antioxidant capacity and antibacterial activity on oral anaerobes of a grape seed extract. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1037–1040, 2009.

GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2512–2518, 2009.

HIDALGO, M.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PASCUAL-TERESA, S. de. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 121, p. 691–696, 2010.

JACKSON, R. S. **Wine science - Principles, practice, perception**. Second edition. Academic Press: California, USA, 1994. 648 p.

JACOB, J. K.; HAKIMUDDIN, F.; PALIYATH, G.; FISHER, H. Antioxidant and antiproliferative activity of polyphenols in novel high-polyphenol grape lines. **Food Research International**, v. 41, p. 419–428, 2008.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIČ, I.; ABRAMOVIČ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715–723, 2010.

KOVAC, V.; ALONSO, E.; BOURZEIX, M.; REVILLA, E. Effect of several enological practices on the content of catechins and proanthocyanidins of red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 1953-1957, 1992.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206–1214, 2007.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, p. 325–329, 2007.

LOMOLINO, G.; ZOCCA, F.; SPETTOLI, P.; ZANIN, G.; LANTE, A. A preliminary study on changes in phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 575–579, 2010.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 30–36, 2010.

MANACH, C., WILLIAMSON, G., MORAND, C., SCALBERT, A.; RÈMÈSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S–242S, 2005.

MAR, M.; ZEISEL, S. H. Betaine in wine: answer to the French paradox? **Medical Hypotheses**, v. 53, n. 5, p. 383–385, 1999.

MARGALIT, Y. **Concepts in Wine Chemistry**. Second edition. San Francisco, CA: Wine Appreciation Guild, USA, 2004. 476 p.

MAZZA, G.; FUKUMOTO, L.; DELAQUIS, P.; GIRARD, B.; EWERT, B. Anthocyanins, Phenolics, and Color of Cabernet Franc, Merlot, and Pinot Noir Wines from British Columbia. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4009-4017, 1999.

MILARDOVIĆ, S.; IVEKOVIC, D.; GRABARIĆ, B. S. A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 175 – 180, 2006.

ÖZKAN, G.; SAGDIÇ, O.; GÖKTÜRK-BAYDAR, N. Antibacterial effect of narince grape (*Vitis vinifera* L.) pomace extract. **S.Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi**, v. 17, n. 32, p. 53 –56, 2003.

PAIXÃO, N.; PERESTRELO, R.; MARQUES, J. C.; CÂMARA, J. S. Relationship between antioxidant capacity and total phenolic content of red, rosé and white wines. **Food Chemistry**, v. 105, p. 204–214, 2007.

PAPADOPOULOU, C.; SOULTI, K.; ROUSSIS, I. G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*,

Escherichia coli and *Candida albicans*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 41–46, 2005.

RHODES, P. L.; MITCHELL, J. W.; WILSON, M. W.; MELTON, L. D. Antilisterial activity of grape juice and grape extracts derived from *Vitis vinifera* variety Ribier. **International Journal of Food Microbiology**, v. 107, p. 281-286, 2006.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L. P. da; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; SANTOS, J. P. A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 941-944, 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Research International**, v. 32, p. 407-412, 1999.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654–658, 2009.

SHAHID, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 130, p. 2073S-2085S, 1992.

SHI, J.; JIANMEL, Y.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality. **Journal of medicinal food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SHRIKHANDE, A. J. Wine by-products with health benefits. **Food Research International**, v. 33, p. 469-474, 2000.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niagara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOOBRAATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMAA, A.; ARUOMAB, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200–213, 2005.

SOVAK, M. D. M. Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. **Journal of medical food**, v. 4, n. 2, p. 93-105, 2001.

STALIKAS, C. D. Review Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of separation science**, v. 30, p. 3268 – 3295, 2007.

THEUNIS, M.; KOBAYASHI, H.; BROUGHTON, W. J.; PRINSEN, E. Flavonoids, NodD1, NodD2, and Nod- Box NB15 modulate expression of the y4wEFG locus that is required for indole-3-acetic acid synthesis in *Rhizobium* sp. strain NGR234. **Molecular Plant-Microbe interaction**, v. 17, n. 10, p. 1153-1151, 2004.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; NADRA, M. C. M. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 587-593, 2007a.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; NADRA, M.C. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93–101, 2007b.

WAITE, J.G.; DAESCHEL, M. A. Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. **Journal of food science**, v. 72, n. 7, p. M286-M291, 2007.

WALKER, T.; MORRIS, J.; THRELFALL, R.; MAIN, G. Analysis of wine components in Cynthiana and Syrah wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1543-1547, 2003.

XIA, E.; DENG, G.; GUO, Y.; LI, H. Review: Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 622-646, 2010.

YIM, N. HA, D. T.; TRUNG, T. N.; KIM, J. P.; LEE, S.; NA, M.; JUNG, H.; KIM, H. S.; BAE, K. The antimicrobial activity of compounds from the leaf and stem of *Vitis amurensis* against two oral pathogens. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 1165-1168, 2010.

CAPÍTULO 2

FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO VINHO ELABORADA COM A UVA MÁXIMO IAC 138-22

Joyce Pellisson Pereira¹, Marcelo Alexandre Prado¹, Marta Cristina Teixeira Duarte²

¹Laboratório de Análises de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

²Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

RESUMO

A uva Máximo IAC 138-22 resulta do cruzamento entre as variedades Seibel e Syrah e apresenta boas características para a produção de vinho como elevado grau Brix, sem a necessidade do processo de chaptalização, como ocorre com grande parte dos vinhos produzidos no estado de São Paulo. Os compostos fenólicos presentes na uva são transferidos para o mosto durante a vinificação e são de grande importância nos vinhos, pois são responsáveis pelas características organolépticas e atividades biológicas, como antioxidante, anticancerígenas, antibióticas, entre outras. Neste trabalho foram analisados extratos obtidos em etanol:água (1:1 v/v) e em acetona:água (1:1 v/v) de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, três estágios da fermentação, vinho e resíduos do processo em relação ao conteúdo fenólico por Folin-Ciocalteu e a atividade antioxidante pelo método de DPPH•. Em relação à atividade antioxidante, não foi verificada diferença significativa entre as duas extrações para a maioria das amostras, exceto a semente e o primeiro resíduo da vinificação. As amostras que apresentaram os maiores teores de fenólicos e também fortes a moderadas atividades antioxidantes definidas pelo AAI foram sementes, resíduos e cascas, o que sugere um potencial para o reaproveitamento dos resíduos em substituição aos antioxidantes sintéticos.

Palavras-chave: uva Máximo IAC 138-22, vinificação, compostos fenólicos, atividade antioxidante, DPPH•, resíduos.

ABSTRACT

Máximo IAC 138-22 grape results from a cross between Seibel and Syrah varieties and it has good features for the production of wine with a high Brix, without the process of sugaring, as most wines produced in the state of São Paulo. Phenolics compounds present in grapes are transferred to the must during winemaking and are of great importance in wines because they are responsible for the organoleptic characteristics and biological activities, such as antioxidant, anticancer, antibiotic, among others. This study analyzed extracts obtained with ethanol:water (1:1 v/v) and acetone:water (1:1 v/v) of Máximo IAC 138-22 grape, skin, pulp, seed, three stages of fermentation, wine, and two samples of waste in relation to phenolics content by Folin-Ciocalteu and antioxidant activity by DPPH• method. About antioxidant activity, there was no significant difference between the two extractions for most samples, except for seeds and the first waste of winemaking. The samples that showed the highest levels of phenolics and also strong to moderate antioxidant activities, defined by AAI, were seeds, skins and wastes, suggesting a potential for the recycling of waste to replace synthetic antioxidants.

Key-words: grape Máximo IAC 138-22, winemaking, phenolics compounds, antioxidant activity, DPPH•, wastes.

1. INTRODUÇÃO

A uva Máximo IAC 138-22, obtida por Santos Neto, em 1946, no Programa de Melhoramento Genético do IAC, é resultado do cruzamento entre as variedades Seibel 11342 (híbrido) e Syrah (*Vitis vinifera*). Esta variedade caracteriza-se por plantas bastante produtivas, de ciclo curto a médio, vigorosas, com dois a três cachos (médios a grandes) por ramo e de boa resistência às doenças (SANTOS NETO et al., 1968 apud TERRA et al., 1990).

As bagas desta uva apresentam tamanho médio, são oval-arredondadas, de coloração preto-azulada, como pode ser observado na Figura 1. Apresentam boa resistência a rachamentos e podridões e possuem teores médios de açúcar de 150 g/L nas regiões mais quentes. O rendimento em vinho é de cerca de 60 % (SANTOS NETO et al., 1968 apud TERRA et al., 1990).



Figura 1. Uva Máximo IAC 138-22.

Atualmente, o plantio desta variedade é feito em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Entre os municípios, destacam-se São Miguel Arcanjo, Indaiatuba, Jundiaí, Jarinu, Louveira, Vinhedo, Valinhos e Monte Alegre do Sul. Por meio do manejo do vinhedo, com a realização de duas podas, tem-se a produção durante o inverno, quando a amplitude de temperatura, ou seja, alta durante o dia e baixa durante a noite, permite a boa maturação da uva e um bom desenvolvimento dos taninos, com elevado grau Brix – acima de 20° Brix – no qual a chaptalização, adição de açúcar de cana, pode ser reduzida, permitindo a obtenção de um vinho de graduação alcoólica de 11° a 12° GL (MESSIAS, 2007).

O processo de transformação do mosto da uva em vinho é denominado de vinificação e é caracterizado pela maceração, período em que a parte sólida da uva permanece em contato com o mosto. É durante este contato que muitos componentes da uva passam para o mosto, inicialmente por um processo de dissolução e depois por difusão. O rendimento em mosto é extremamente variável de uma cultivar a outra e, para uma mesma cultivar, aumentos importantes podem ocorrer dependendo da fase de maturação da uva utilizada, principalmente em consequência de precipitações pluviométricas intensas (RIZZON et al., 1999).

Entre os principais componentes extraídos da uva para o mosto estão os compostos fenólicos e, portanto, as práticas enológicas podem afetar a qualidade e quantidade destes compostos no vinho. Outros fatores que interferem na extração de fenólicos são períodos longos de exposição de cascas e sementes ao mosto a baixas temperaturas (LOMOLINO et al., 2010).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários produzidos pelas plantas e que desempenham funções no crescimento, desenvolvimento e defesa do vegetal. Estes compostos estão presentes em grandes quantidades em vinhos, advindos da uva, além do metabolismo dos micro-organismos da fermentação e da madeira dos tonéis durante o envelhecimento. Os compostos fenólicos são responsáveis por diversas atividades biológicas, como antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatórias, entre outras (XIA et al., 2010; GHARRAS, 2009; CUSHNIE e LAMB, 2005; FLAMINI, 2003; BRAVO, 1998; JACKSON, 1994).

Os fenólicos presentes nas cascas das uvas são extraídos mais rápido e facilmente quando comparadas às sementes. Portanto, as cascas contribuem com a maior parte dos fenólicos totais do vinho. Uma das técnicas utilizadas para aumentar o conteúdo fenólico é a extensão do período de maceração no fim da fermentação. Desta maneira, pode-se aumentar o conteúdo de flavonóides, como flavan-3-ols, resultantes principalmente das sementes (LOMOLINO et al., 2010).

Os ácidos caféico e gálico, que pertencem respectivamente a ácidos cinâmicos e benzóicos, são os fenólicos presentes em maiores quantidades em vinhos. O ácido gálico é um composto com alta atividade antioxidante contra radicais livres. O ácido caféico localiza-se principalmente na primeira camada da casca da uva, em concentrações 100 vezes maiores que na polpa e seu teor diminui durante o processamento do vinho. O ácido caféico é presente em baixas concentrações na forma livre no vinho, devido à esterificação com ácido tartárico, o que leva a produção de ácido caftárico, composto facilmente oxidado e responsável pelo escurecimento do vinho. O ácido caféico é um poderoso antioxidante,

protege lipoproteínas de baixa densidade da oxidação (LDL) e se liga a radicais livres e oxigênio singlete (LOMOLINO et al., 2010).

Durante o processamento do vinho, ocorre a extração hidroalcoólica dos compostos fenólicos, tanto qualitativa quanto quantitativamente limitante, sendo, portanto, difícil a obtenção de uma extração completa e controlada da uva para o mosto do vinho (SOVAK, 2001). Deste modo, os resíduos da vinificação contêm elevados teores de fenólicos totais com atividades biológicas e poderiam substituir antioxidantes sintéticos, visto que apresentariam baixos custos e a possibilidade de redução de problemas ambientais com seu descarte (AMENDOLA et al., 2010; LAFKA et al., 2007; ARVANITOYANNIS et al., 2006; CRUZ et al., 2004; MOURE et al., 2001).

Antioxidantes naturais de resíduos podem ser usados na prevenção da peroxidação lipídica de alimentos. O aumento da estabilidade de oxidação de óleos vegetais é importante para a prática industrial e muitos testes antioxidantes são baseados na habilidade de retardar ou inibir a produção de ranço (MOURE et al., 2001). Embora os antioxidantes naturais apresentem um poder antioxidante menor quando comparados aos sintéticos, o seu uso não é limitado. Neste caso, estudos econômicos e de toxicidade devem ser considerados antes da aplicação (MOURE et al., 2001).

A avaliação do conteúdo de fenólicos e da atividade antioxidante requer uma extração eficiente das amostras a serem analisadas. Diferentes extrações com metanol, etanol, etanol:água, acetona, isopropanol e acetato de etila promovem perfis de fenólicos tanto quantitativa quanto qualitativamente diferentes. As diferentes atividades antioxidantes dos extratos fenólicos podem ser atribuídas às diferentes polaridades que cada solvente

apresenta, além das diferentes metodologias empregadas para a extração e purificação dos compostos ativos (LAFKA et al., 2007).

Extrações hidroalcoólicas são ainda mais eficientes que o próprio solvente puro, sendo o etanol o mais utilizado, por ser um solvente polar e responsável pela extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis e taninos de matérias vegetais (LOMOLINO et al., 2010)

Diversos estudos correlacionam a presença de fenólicos à atividade antioxidante em uvas (ANASTASIADI et al., 2010; BREKSA et al., 2010; AMICO et al., 2008), casca de uva (KATALINIĆ et al., 2010), resíduos da vinificação (ANASTASIADI et al., 2010) e vinhos (GINJOM et al., 2011; LUCENA et al., 2010; ANASTASIADI et al., 2010; ROUSSIS et al., 2008).

Estas determinações são importantes visto que não existem dados disponíveis na literatura que façam referências para estas análises em relação a esta uva, que é muito utilizada na produção de vinhos tintos no estado de São Paulo. Estes conhecimentos são úteis para os consumidores que buscam os benefícios do vinho para a saúde e para os produtores que procuram agregar valor de mercado a seus produtos. Como este projeto se insere num contexto de preocupação com os resíduos do processamento dos vinhos, serão avaliadas estas propriedades dos resíduos, visando possíveis aplicações em indústrias de alimentos como antioxidantes naturais.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo quantificar os compostos fenólicos de extratos obtidos com diferentes soluções extratoras (etanol:água 1:1 v/v e acetona:água 1:1 v/v) da uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, de três etapas da vinificação do vinho artesanal produzido com esta uva e de dois resíduos gerados neste processamento.

Estas amostras também foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pelo método de DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

2.1. AMOSTRAS

Foram avaliadas amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa e semente, três estágios da vinificação, denominados como mosto inicial, mosto intermediário e mosto final, dois resíduos do processamento do vinho, denominados como primeiro e segundo resíduos, e o vinho obtido deste processo. A figura 2 apresenta o processo de obtenção das amostras.

Dois quilogramas de uva Máximo IAC 138-22 foram obtidos em uma propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP e congelados no dia da colheita, em 21 de janeiro de 2009. Porções da uva foram descongeladas de acordo com a necessidade e as cascas, polpas e sementes da uva foram posteriormente separadas e avaliadas quanto à composição fenólica total e à atividade antioxidante. As amostras de mosto, resíduos e o vinho foram obtidos artesanalmente em uma propriedade localizada na cidade de Valinhos/SP, que produz o vinho a partir das uvas obtidas na mesma propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP. A produção anual de vinho deste produtor é de aproximadamente 180 litros.

As uvas foram esmagadas em 22 de janeiro de 2009, sendo adicionado ao mosto 30 g de levedura, 30 g de nutriente e 10 g de dióxido de enxofre. O tempo de maceração foi de três dias. No segundo dia, foi retirado um litro do mosto para análise, denominado como mosto inicial, e a primeira amostra de resíduo (dois quilogramas). No terceiro dia, foi realizada a primeira trasfega, retirando-se cascas, sementes e borra, sendo obtido o segundo resíduo (dois quilogramas).

Em seguida, o produto foi armazenado em tanques fechados apenas com respiro e em 06 de março de 2009 foi realizada a segunda trasfega, sendo retirado um litro de mosto, que foi denominado como mosto intermediário. Nesta etapa, foi verificada uma graduação alcoólica de 8,9 ° GL, sendo esta corrigida para 10° GL pela adição de quatro litros de álcool vínico, além de 20 g de dióxido de enxofre. Em 8 de abril de 2009 foi realizada a terceira trasfega, sendo retirado um litro de mosto, denominado como mosto final. Em 4 de agosto de 2009 foram realizadas a quarta trasfega e a adição de 2 g de dióxido de enxofre. O vinho foi engarrafado e mantido por quatro a seis meses nestas condições antes do consumo. O vinho analisado neste trabalho foi mantido nestas condições por 15 meses. Todas as amostras, exceto o vinho, foram congeladas a -20 ° C até a extração.

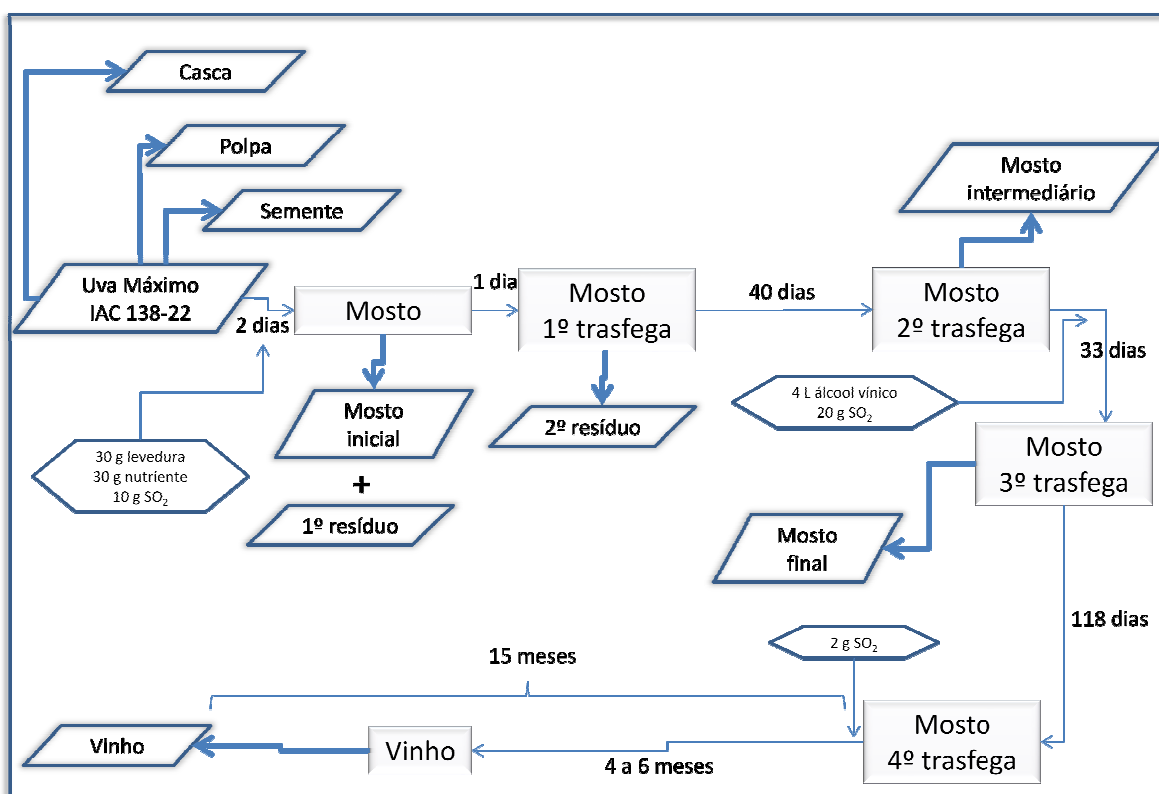


Figura 2. Processo de obtenção das amostras. Legenda: amostras analisadas neste trabalho; etapas do processo; adição de componentes necessários para a vinificação.

2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E ÁLCOOL DAS AMOSTRAS

As amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, mosto inicial, mosto intermediário, mosto final, resíduos e vinho foram submetidas à secagem em estufa a vácuo a temperatura de 40 °C a 50 °C até a obtenção de peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 2005). O teor de umidade das amostras de uva, casca, polpa e semente foi calculado pela razão entre a massa de água contida na amostra e massa de amostra úmida, sendo expresso em porcentagem. O teor de água mais álcool das amostras de mosto inicial, mosto intermediário, mosto final e vinho foi calculado pela razão entre a massa de água mais álcool contida nas amostras e a massa de amostra úmida, sendo expresso em porcentagem.

2.3. EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada pela metodologia modificada de Scherer e Godoy (2009). As amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, mosto e resíduos foram maceradas e submetidas à extração em uma solução etanol:água (1:1 v/v) em uma proporção 1:10 (m/v ou v/v) amostra:solvente, com agitação no escuro e a temperatura ambiente por 80 minutos e, em seguida, à filtração a vácuo. O resíduo sólido foi re-extraído pelo mesmo método descrito acima. Os dois extratos obtidos foram misturados e o solvente evaporado em evaporador rotativo (38 °C a 150 rpm) até a obtenção de extrato seco, denominado por “I”. Todas as amostras foram também submetidas à extração em uma solução acetona:água (1:1 v/v) em uma proporção 1:10 (m/v ou v/v) amostra:solvente pela metodologia descrita acima. Neste caso, o extrato seco foi denominado por “II”. A amostra de vinho foi submetida à agitação no escuro e a temperatura ambiente por 160 minutos e, em seguida, à filtração a vácuo, sem a adição de solvente. O rendimento do processo foi definido como sendo a massa final obtida em função da massa inicial de amostra usada na extração em porcentagem.

Os extratos secos foram diluídos em solução etanol:água (1:1 v/v) em concentrações conhecidas para as análises de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. O processo de obtenção dos extratos pode ser verificado na Figura 3.

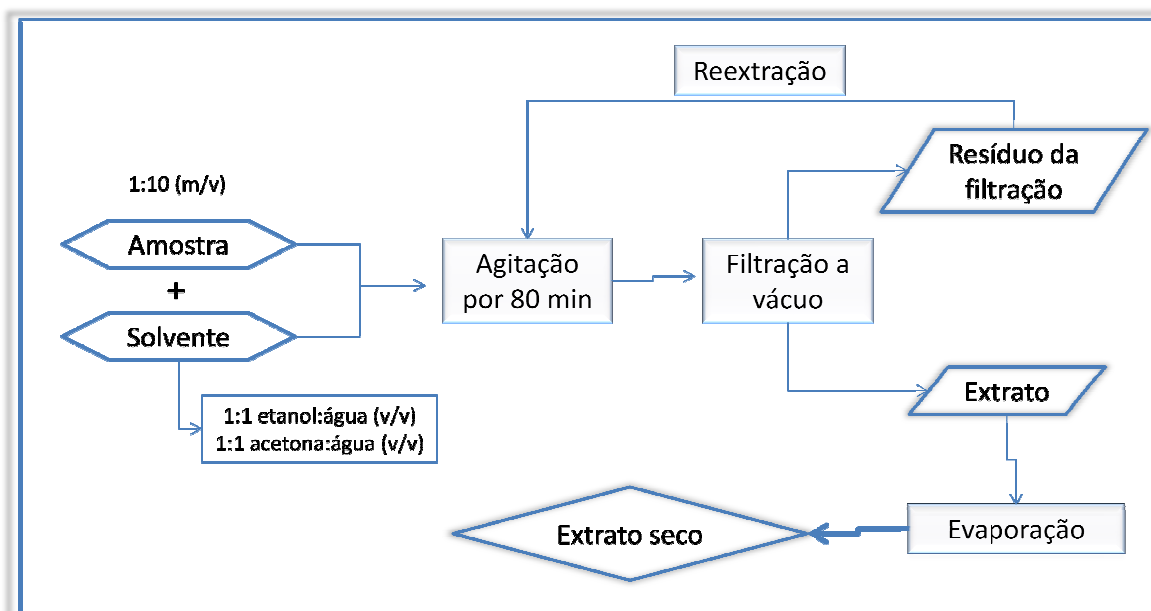


Figura 3. Processo de obtenção dos extratos. Legenda: ▱ amostras obtidas no processo de extração; □ etapas do processo; ⬡ amostra e solvente; ◇ extrato final usado nas análises.

2.4. FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais das amostras de uva, mosto, vinho e resíduos foi determinado pelo método espectrofotométrico com reagente Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão (SINGLETON e ROSSI, 1965). Foi feita uma curva de calibração do ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco (mg EAG/g extrato) para todas as amostras. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada a 2,5 mL de Folin-Ciocalteau 10 % em água destilada. Após 5 minutos de reação, foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5 %. A absorbância a 740 nm em espectrofotômetro (UV 1600, Pró-Análise) foi medida após 2 horas de reação na ausência de luz.

2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das amostras foi determinada pelo método de DPPH• (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila), segundo Brand-Willians et al. (1995). Uma alíquota de 0,1 mL de amostra diluída em etanol:água (1:1 v/v) foi adicionada a 3,9 mL de solução metanólica de DPPH• 0,1 mM. Após 90 minutos de incubação no escuro e a temperatura ambiente, a absorbância foi verificada em espectrofotômetro (UV 1600, Pró-Análise) a 517 nm.

A atividade antioxidante foi determinada em relação à porcentagem de inibição do radical DPPH• (I %), de acordo com a equação abaixo relacionada, em que ABS_o é a absorbância do branco (0,1 mL de metanol em substituição à amostra) e Abs_i é a absorbância da solução com a amostra. A partir da curva I % *versus* a concentração da amostra foi obtido o valor IC 50%, ou seja, a concentração de amostra que neutraliza 50 % dos radicais livres da solução metanólica de DPPH•.

$$I \% = \frac{ABS_o - Abs_i}{ABS_o} \times 100$$

$$Abs_o$$

O índice de atividade antioxidante (IAA) foi calculado segundo Scherer e Godoy (2009), de acordo com a fórmula abaixo, na qual permite classificar uma amostra de acordo com seu potencial antioxidante, como baixa, moderada, forte ou muito forte.

$$\text{IAA} = \frac{\text{concentração de DPPH} \bullet \text{ final } (\mu\text{g.mL}^{-1})}{\text{IC 50\% } (\mu\text{g.mL}^{-1})}$$

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o teor de umidade para as amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa e semente e a tabela 2 o teor de água mais álcool das amostras de mosto inicial, mosto intermediário, mosto final, resíduos e vinho.

A baga da uva é formada em geral por 6 a 12 % de casca, 2 a 5 % de semente e 85 a 92 % de polpa, sendo esta última constituída de 65 a 85% de água e de 12 a 25 % de açúcares redutores (SOUZA et al., 2010). A uva Máximo IAC 138-22 apresentou cerca de 78,58 % de umidade e a polpa 82,46 %. Em relação à variedade, colheita e grau de maturação da uva, o teor de umidade está compreendido entre 65 a 94 %. A água serve de veículo e de solvente às diversas matérias elaboradas pela uva e é o único constituinte líquido do mosto (SOUZA et al., 2010). Entre as amostras, a semente apresentou o menor teor de umidade (cerca de 30,79 %).

Tabela 1: Teor de umidade.

Amostra	Teor de água (%)
Uva	78,58 ± 0,83
Polpa	82,46 ± 0,17
Casca	78,62 ± 0,24
Semente	30,79 ± 0,70

Tabela 2: Teor de água e álcool.

Amostra	Teor de água + álcool (%)
Mosto inicial	85,99 ± 0,04
Mosto intermediário	90,55 ± 0,12
Mosto final	92,54 ± 0,23
1º resíduo	63,24 ± 0,80
2º resíduo	79,90 ± 0,80
Vinho	95,68 ± 0,15

Os rendimentos das extrações I e II foram calculados e estão apresentados na Tabela 3. Os maiores teores de rendimento foram verificados para as amostras como a uva, casca e polpa, provavelmente devido ao elevado teor de açúcar. Isto ocorre porque os solventes alcoólicos são responsáveis por uma extração não seletiva com alto rendimento (SPIGNO et al., 2007). Extrações hidroalcoólicas de amostras de frutas ou subprodutos geram extratos com elevadas quantidades de açúcares e polissacarídeos, que podem ser purificados através de colunas C-18, por exemplo, eliminando-se açúcares, ácidos não voláteis e aminoácidos. Extratos purificados apresentam maiores teores de fenólicos por grama de extrato, entretanto, este é um processo caro e que pode eliminar compostos fenólicos. Além disso, em algumas aplicações industriais de extratos, a remoção de açúcar não é necessária (SPIGNO et al., 2007).

Tabela 3: Porcentagem de rendimento das extrações I e II*.

Extratos	Rendimento da extração (%)	
	Amostra I	Amostra II
Polpa	17,16 ± 1,45 ^{cd}	19,78 ± 0,11 ^b
Casca	15,07 ± 0,01 ^{de}	12,66 ± 0,44 ^f
Semente	6,99 ± 0,13 ^{hi}	10,14 ± 0,39 ^g
Uva	17,34 ± 1,48 ^c	22,46 ± 1,55 ^a
Mosto inicial	13,47 ± 0,48 ^{ef}	12,55 ± 0,12 ^f
Mosto intermediário	2,25 ± 0,26 ^l	3,40 ± 0,08 ^{ijkl}
Mosto final	3,70 ± 0,37 ^{ijkl}	3,62 ± 0,02 ^{ijkl}
1º resíduo	7,38 ± 0,32 ^h	8,53 ± 0,88 ^{gh}
2º resíduo	3,10 ± 0,71 ^{kl}	5,22 ± 0,11 ^{ij}
Vinho**	4,38 ± 0,09 ^{jk}	

As letras indicam rendimentos com valores estatisticamente distintos pelo método de Tukey.

*Amostra I refere-se a extratos obtidos em solução etanol:água (1:1 v/v) e amostra II refere-se à extratos obtidos em solução acetona:água (1/1 v/v). ** A extração do vinho foi realizada sem a adição de solvente.

A quantificação de fenólicos totais pelo método espectrofotométrico com reagente Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão, foi realizada para todos os extratos. A Figura 4 apresenta a reta padrão do ácido gálico, utilizada para os cálculos do conteúdo de fenólicos totais em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de extrato).

Os resultados da quantificação de fenólicos totais determinados para todas as amostras em triplicata estão apresentados na Tabela 4. Estes resultados foram submetidos ao teste estatístico pelo método de Tukey, sendo possível aferir que não houve diferença estatística entre as extrações I e II para as amostras de polpa, casca, uva, mostos inicial, intermediário e final, e segundo resíduo da vinificação. Entretanto, o extrato da semente

obtido com a solução etanol:água (1:1 v/v) apresentou maior teor de fenólicos totais que o extrato obtido em acetona:água (1:1 v/v).

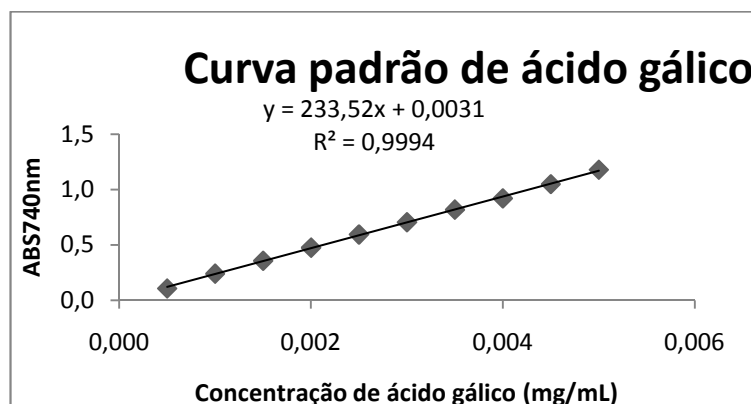


Figura 4: Curva de calibração de ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Tabela 4: Conteúdo fenólico total em equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mg de EAG/g de extrato) dos extratos I e II*.

Extratos	Conteúdo fenólico total (mg de EAG/g de extrato)	
	Amostra I	Amostra II
Polpa	3,86 ± 0,10 ^f	3,81 ± 0,17 ^f
Casca	55,79 ± 6,83 ^d	58,79 ± 7,22 ^d
Semente	136,40 ± 5,29 ^a	120,67 ± 6,82 ^b
Uva	12,83 ± 0,67 ^f	14,84 ± 0,57 ^f
Mosto inicial	3,72 ± 0,34 ^f	5,10 ± 0,46 ^f
Mosto intermediário	39,23 ± 2,10 ^e	32,76 ± 0,50 ^e
Mosto final	35,30 ± 1,02 ^e	30,45 ± 1,52 ^e
1º resíduo	67,33 ± 1,08 ^{cd}	72,85 ± 5,62 ^c
2º resíduo	78,47 ± 2,34 ^c	74,42 ± 7,34 ^c
Vinho**	41,43 ± 0,62 ^e	

As letras indicam rendimentos com valores estatisticamente distintos pelo método de Tukey.

*Amostra I refere-se a extratos obtidos em solução etanol:água (1:1 v/v) e amostra II refere-se à extratos obtidos em solução acetona:água (1/1 v/v).

**A extração do vinho foi realizada sem a adição de solvente.

As amostras de polpa, uva Máximo IAC 138-22 e mosto inicial apresentaram os menores teores de fenólicos totais, como pode ser observado na Tabela 4. Não houve diferença entre a quantidade de fenólicos observada nos extratos de mosto intermediário, mosto final e vinho, entretanto não é possível afirmar se houve alguma mudança qualitativa, o que poderia ser avaliado em trabalhos futuros com a identificação e quantificação dos compostos fenólicos majoritários de cada amostra.

Os extratos de ambos os resíduos apresentaram conteúdo elevado de fenólicos, demonstrando que não houve a completa extração dos compostos da uva para o mosto durante a vinificação deste vinho. Deste modo, os resíduos da vinificação da uva Máximo IAC 138-22 constituem uma fonte de baixo custo para a extração de compostos fenólicos com atividades biológicas que poderiam ser utilizadas pelas indústrias de alimentos para a produção de suplementos alimentares, isolamento de ingredientes para alimentos funcionais ou ainda para a extração de óleo das sementes com potencial antioxidante, como sugerido por Arvanitoyannis et al. (2006) para resíduos de outras uvas.

Além do conteúdo fenólico, a capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada pelo método de DPPH•, sendo realizada a curva padrão da porcentagem de redução deste radical *versus* a concentração do extrato. Como pode ser observado na Tabela 3, os valores de R-quadrado (r^2) indicam que as curvas padrão de cada amostra apresentaram valores lineares. Através da equação da reta obtida para cada triplicata foi possível calcular os valores de IC₅₀ em mg/mL (concentração do extrato capaz de reduzir em 50 % a solução de DPPH•) e AAI (índice de atividade antioxidante). Os resultados obtidos podem ser verificados na Tabela 5.

Tabela 5: Capacidade antioxidante dos extratos I e II*.

Extratos	r²	IC₅₀ (mg/mL)	AAI
Polpa I	0,9906-0,9908	1,74 ± 0,25 ^a	0,023 ± 0,003
Polpa II	0,9844-0,9945	1,544 ± 0,272 ^a	0,026 ± 0,004
Casca I	0,9918-0,9967	0,0997 ± 0,011 ^b	0,400 ± 0,044
Casca II	0,9919-0,9936	0,074 ± 0,013 ^b	0,546 ± 0,088
Semente I	0,9945-0,9978	0,024 ± 0,006 ^b	1,717 ± 0,415
Semente II	0,9915-0,9990	0,027 ± 0,006 ^b	1,487 ± 0,300
Uva I	0,9813-0,9908	0,358 ± 0,025 ^b	0,110 ± 0,008
Uva II	0,9936-0,9970	0,245 ± 0,023 ^b	0,162 ± 0,014
Mosto inicial I	0,9900-0,9959	1,824 ± 0,699 ^a	0,027 ± 0,012
Mosto inicial II	0,9902-0,9999	1,438 ± 0,356 ^a	0,028 ± 0,007
Mosto intermediário I	0,9915-0,9992	0,154 ± 0,022 ^b	0,260 ± 0,036
Mosto intermediário II	0,9940-0,9905	0,153 ± 0,009 ^b	0,258 ± 0,015
Mosto final I	0,9936-0,9975	0,176 ± 0,042 ^b	0,232 ± 0,049
Mosto final II	0,9918-0,9961	0,162 ± 0,014 ^b	0,249 ± 0,023
1º resíduo I	0,9923-0,9930	0,065 ± 0,009 ^b	0,618 ± 0,082
1º resíduo II	0,9908-0,9994	0,056 ± 0,008 ^b	0,717 ± 0,106
2º resíduo I	0,9950-0,9957	0,048 ± 0,016 ^b	0,912 ± 0,377
2º resíduo II	0,9903-0,9999	0,091 ± 0,005 ^b	0,432 ± 0,024
Vinho	0,9903-0,9904	0,218 ± 0,008 ^b	0,181 ± 0,007
Ácido gálico	0,9914-0,9991	0,002 ± 0,001 ^b	24,555 ± 1,864

As letras indicam rendimentos com valores estatisticamente distintos pelo método de Tukey.

*Amostra I refere-se a extratos obtidos em solução etanol:água (1:1 v/v) e amostra II refere-se à extratos obtidos em solução acetona:água (1/1 v/v).

De acordo com Gan e Latiff (2011), a acetona promove um maior rendimento de fenólicos que o etanol, metanol, acetato de etila e hexano, o que não foi aplicável para as amostras analisadas neste trabalho, como pode ser observado na Tabela 5. Neste trabalho não foi observado diferença significativa entre as soluções extratoras, portanto, é possível sugerir para trabalhos futuros ou para extrações em escala industrial a extração hidroalcoólica, que é menos tóxica e de menor custo.

Em trabalho realizado por Lafka et al. (2007), o extrato hidroalcoólico apresentou o maior teor de fenólicos, entretanto este não exibiu a maior atividade antioxidante. Extrações hidroalcoólicas são ainda mais eficientes que o próprio solvente puro, sendo o etanol o mais utilizado, por ser um solvente polar e responsável pela extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis e taninos de matérias vegetais (LOMOLINO et al., 2010).

Em estudo realizado por Spigno et al. (2007) foi verificado que o rendimento de fenólicos foi aumentado com a elevação da quantidade de água na porcentagem de etanol de 10 para 30 %. Entretanto, não houve mudança significativa na extração quando avaliada concentração de água em etanol de 30 a 60 %. Yilmaz e Toledo (2006) demonstraram que o conteúdo fenólico de extratos etanólicos de sementes de uva aumentou com o aumento da concentração de água de 0 a 30 %, mas se manteve constante em 30, 40 e 50 % e diminuiu com concentrações elevadas. Assim, seria interessante avaliar essa redução de solvente para extrações das amostras analisadas neste trabalho, diante da preocupação com a geração de resíduos de solventes e contaminação ambiental.

Não houve diferença significativa para a maioria das amostras quando avaliados as porcentagens de inibição de 50 % do radical DPPH• (IC_{50} %), entretanto foi possível verificar por estes valores a quantidade de extrato que promove esta redução. Assim, valores menores de IC_{50} % indicam amostras com atividade antioxidante superior a extratos com IC_{50} % maiores. O extrato I de semente apresentou o menor IC_{50} % (0,024 mg/mL) e, portanto, possui forte capacidade para capturar radicais livres. Os compostos fenólicos responsáveis por esta atividade poderiam ser isolados e aplicados nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

De acordo com a classificação sugerida por Scherer e Godoy (2009), ambos os extratos de polpa, uva, mosto inicial, intermediário e final, vinho e o extrato I de casca e o extrato II do 2º resíduo apresentaram baixa atividade antioxidante ($AAI < 0,5$). O extrato II de casca apresentou atividade moderada, assim como ambos os extratos do primeiro resíduo da vinificação e o extrato II do segundo resíduo da vinificação ($0,5 < AAI < 1,0$). O extrato I e II da semente apresentou forte atividade antioxidante ($1,0 < AAI < 2,0$) e o padrão de ácido gálico apresentou atividade antioxidante muito forte ($AAI > 2,0$).

Os maiores teores de fenólicos foram verificados nos extratos de sementes, que também apresentaram elevados índices de atividade antioxidante (AAI). As sementes contêm lipídios, proteínas, carboidratos e cerca de 5 a 8 % de polifenóis, dependendo da variedade da uva (CHEDEA et al., 2010). Os principais fenólicos encontrados nas sementes são monômeros de flavan-3-ols (catequina, epicatequina, galocatequina, epigalocatequina, epicatequina 3-O-galato), além de dímeros, trímeros e procianidinas altamente polimerizadas e precursores de ácidos fenólicos (ácido gálico). Por esta razão, extratos de sementes são considerados os antioxidantes mais potentes (CHEDEA et al., 2010). SHI et al. (2003) também verificaram em extrato etanol/água 1:1 v/v de sementes os seguintes fenólicos majoritários: catequina, epicatequina, ácido gálico e galato de epicatequina, que apresentam propriedade antioxidante.

Assim, as sementes de uva Máximo IAC 138-22 poderiam ser utilizadas na indústria farmacêutica, após o isolamento de compostos como proantocianidinas, que possuem atividades farmacológicas e potenciais terapêuticos, como efeito cardioprotetor; e catequinas, epicatequinas e procianidinas, que apresentam efeitos antimutagênicos e antivirais (KIM et al., 2006).

Elevados teores de fenólicos também foram verificados nos extratos dos resíduos da vinificação, fato que se deve à extração hidroalcoólica tanto qualitativa quanto quantitativamente limitante que ocorre naturalmente durante a vinificação, sendo, portanto, difícil a obtenção de uma extração completa e controlada durante o processamento do vinho (SOVAK, 2001). O extrato obtido em etanol:água (1:1 v/v) do segundo resíduo deste processamento apresentou teor de fenólicos totais de 78,47 mg EAG/g extrato e IC₅₀ % de 0,048 mg/mL e atividade antioxidante moderada (AAI entre 0,5 e 1,0).

Os resíduos da vinificação da uva Máximo IAC 138-22 apresentaram elevados teores de fenólicos, portanto, além do reaproveitamento destas amostras, é possível sugerir um aumento no período maceração. Esta ação poderia promover um aumento no conteúdo fenólico do mosto e obtenção de vinho com características organolépticas mais marcantes (LOMOLINO et al., 2010; VÁZQUEZ et al., 2010). Entretanto, são necessários estudos sensoriais, pois uma extração em excesso poderia promover forte adstringência, comprometendo a qualidade e aceitação do vinho.

Ademais, estes resíduos apresentaram de baixa a moderada atividade antioxidante, verificado pelo AAI, entretanto cerca de quatro a nove vezes maior que a atividade dos extratos de uva, o que pode indicar a presença de fenólicos advindos de outras fontes além da uva, como o metabolismo dos micro-organismos (JACKSON, 1994). Ainda, pode ter havido durante a fermentação a interação entre compostos fenólicos e outras moléculas com a formação de novos compostos, responsáveis pela estabilidade da cor e maturação dos vinhos. Fatores como tempo de armazenamento, temperatura e presença de dióxido de enxofre diminuem a concentração de antocianinas e aumentam o conteúdo de pigmentos poliméricos (VÁZQUEZ et al., 2010).

Segundo Lafka et al. (2007), a atividade antioxidante dos resíduos da vinificação são devido à presença de principalmente ácido gálico, catequina e epicatequina, além de hidroxitirosol, tirosol, glicosídeos de cianidina e vários ácidos fenólicos, como o ácido caféico, ácido vanílico e o- e p-cumárico.

Os extratos de polpa de uva Máximo IAC 138-22 e o mosto inicial da fermentação apresentaram baixo teor de fenólicos e baixa atividade antioxidante. Em uvas, os fenólicos se distribuem em cerca de 10 % ou menos na polpa (SOUZA et al.,2010). Assim, pode-se supor que a polpa da uva Máximo IAC 138-22 pouco contribui para o conteúdo fenólico do mosto inicial e o seu consumo *in natura* não traz benefícios significativos para a saúde em relação a compostos com atividade antioxidante, se não for associado ao consumo da casca.

Os extratos I e II de uva Máximo apresentaram 1283 e 1484 mg EAG/100 g de extrato, respectivamente. Através do rendimento da extração (Tabela 2), é possível calcular o teor de fenólicos na amostra úmida. Assim, cerca de 5,77 g de uva úmida rende 1 g de extrato seco (I), que possui 12,83 mg de EAG, ou ainda, 222,36 mg EAG/100 g de uva Máximo IAC 138-22. Estes resultados são superiores aos encontrados para os cultivares Niágara Rosada IAC 766 (208 EAG/100 g de amostra), Niágara Rosada 196-17 (214 EAG/100 g de amostra), Moscato Embrapa (65 EAG/100 g de amostra) e inferiores aos fenólicos observados para os cultivares Syrah (385 EAG/100 g de amostra) e Merlot (337 EAG/100g de amostra) (ABE et al., 2007).

O vinho Máximo obtido neste processamento apresentou teor de fenólicos semelhante aos extratos de mosto intermediário e final, assim como a atividade antioxidante, diferente do esperado. Isto porque durante o envelhecimento pode ter havido a precipitação de alguns fenólicos, diminuindo assim o conteúdo e atividade biológica, como

observado por Roussis et al. (2008). Além disso, este vinho não foi armazenado em tonéis de madeira, ação que pode contribuir para o aumento do conteúdo de fenólicos em relação ao mosto, devido à migração de fenólicos da madeira dos tonéis para o vinho (JACKSON, 1994).

Ademais, geralmente há a diminuição do conteúdo de ácido caféico (composto de elevado potencial antioxidante) durante o processamento do vinho, devido à esterificação com ácido tartárico, que leva a produção de ácido caftárico, que é facilmente oxidado e responsável pelo escurecimento do vinho (LOMOLINO et al., 2010).

De acordo com a Tabela 2, é possível verificar o rendimento de vinho Máximo em extrato seco, ou seja, um grama de extrato é obtido a partir de 22,7 mL de vinho. Assim, em relação ao conteúdo de fenólicos totais, há aproximadamente 182 mg EAG/100 mL de vinho Máximo ou 1,82 g EAG/L de vinho. Majo et al. (2008) verificaram 2,72 g EAG/L de vinho Cabernet-Sauvignon, 2,99 g EAG/L de vinho Merlot e 1,47 g EAG/L de vinho Syrah, todos da safra de 2004. Li et al. (2009) verificaram teor de fenólicos de 1,402 a 3,130 g EAG/L de vinho tinto, 0,741 a 1,086 g EAG/L de vinho rosé e 0,189 a 0,495 g EAG/L em vinhos brancos.

Os extratos I e II de casca de uva Máximo IAC 138-22 apresentaram 55,793 EAG/g de extrato e 58,789 EAG/g de extrato, respectivamente, e atividade antioxidante de baixa a moderada. A análise de polifenóis na casca é importante porque esta é a parte da uva que mais contribui para estes compostos no vinho (GUERRERO et al. 2009), visto que cerca de 28 a 35 % da casca é composta por estes compostos (SOUZA et al., 2010). Em cultivares “Isabel” e “Niagara” foram encontrados valores de 219,56 a 1242,78 mg.100g⁻¹ de peso seco (SOARES et al., 2008).

A avaliação de fenólicos e atividade antioxidante de cascas de uva é importante, pois estas são consumidas *in natura* e indiretamente em sucos, geléias e vinhos. A atividade antioxidante em termos de capacidade de redução de radicais livres é relativamente alta em comparação com outros alimentos (BARTOLOMÉ et al., 2004), podendo ser utilizadas como ingredientes de suplementos alimentares e como aditivos naturais para a preservação de alimentos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho demonstram que não há diferença significativa entre as extrações I e II para a maioria das amostras analisadas.

Elevadas quantidades de fenólicos foram verificados nas amostras de sementes, resíduos e casca da uva Máximo IAC 138-22, acompanhadas por elevadas atividades antioxidantes verificadas pelo método de DPPH•.

O uso de solventes hidroalcoólicos promove extrações não seletivas com alto rendimento, em alguns casos com baixo teor de fenólicos totais. Portanto, extrações mais seletivas ou ainda processos de purificação podem aumentar a capacidade antioxidante dos extratos.

Os resíduos produzidos durante a vinificação da uva Máximo IAC 138-22 apresentaram quantidade elevadas de fenólicos e atividades antioxidantes moderadas. Estudos futuros sobre a toxicidade e aplicação destes resíduos na indústria de alimentos são importantes para o seu reaproveitamento.

5. REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; MOTA, R. V. da; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.

AMENDOLA, D.; FAVERI, D. M.; SPIGNO, G. Grape marc phenolics: Extraction kinetics, quality and stability of extracts. **Journal of Food Engineering**, v. 97, p. 384–392, 2010.

AMICO, V.; CHILLEMI, R.; MANGIAFICO, S.; SPATAFORA, C.; TRINGALI, C. Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC–DAD analysis and antioxidant activity. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 5960–5966, 2008.

ANASTASIADI, M.; PRATSINIS, H.; KLETSAS, D.; SKALTSOUNIS, A.; HAROUTOUNIAN, A. Bioactive non-coloured polyphenols content of grapes, wines and vinification by-products: Evaluation of the antioxidant activities of their extracts. **Food Research International**, v. 43, p. 805–813, 2010.

ARVANITOYANNIS, I. S.; LADAS, D.; MAVROMATIS, A. Potential uses and applications of treated wine waste: a Review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 475–487, 2006.

BARTOLOMÉ, B.; NUNEZ, V.; MONAGAS, M.; GOMEZ-CORDOVES, C. *In vitro* antioxidant activity of red grape skins. **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 173–177, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BRESKA, A. P.; TAKEOKA, G. R.; HIDALGO, M. B.; VILCHES, A.; VASSE, J.; RAMMING, D. W. Antioxidant activity and phenolic content of 16 raisin grape (*Vitis vinifera* L.) cultivars and selections. **Food Chemistry**, v. 121, p. 740–745, 2010.

CHEDEA, V. S.; BRAICU, C.; SOCACIU, C. Antioxidant/prooxidant activity of a polyphenolic grape seed extract. **Food Chemistry**, v. 121, p. 132–139, 2010.

CRUZ, J. M.; DOMIÄNGUEZ, H.; PARAJOÄ, J. C. Assessment of the Production of Antioxidants from Winemaking Waste Solids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 18, p. 5612-5620, 2004.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Review Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p. 218– 250, 2003.

GAN, C.; LATIFF, A. A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1277–1283, 2011.

GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2512–2518, 2009.

GINJOM, I.; D'ARCY, B.; CAFFIN, N.; GIDLEY, M. Phenolic compound profiles in selected Queensland red wines at all stages of the wine-making process. **Food Chemistry**, v. 125, p. 823–834, 2011.

GUERRERO, R. F.; LIAZID, A.; PALMA, M.; PUERTAS, B.; GONZÁLES-BARRIO, R.; GIL-IZQUIERDO, A. Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. **Food Chemistry**, v. 112, p. 949–955, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos** - 4ª Edição. 1ª Edição Digital. Capítulo IV - Procedimentos e Determinações Gerais. 2005.

JACKSON, R. S. **Wine science - Principles, practice, perception**. Second edition. Academic Press: California, USA, 1994. 648 p.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIČ, I.; ABRAMOVIČ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715–723, 2010.

KIM, S.; JEONG, S.; PARK, W.; NAM, K. C.; AHN, D. U.; LEE, S. Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. **Food Chemistry**, v. 97, p. 472–479, 2006.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206–1214, 2007.

LI, H.; WANG, X.; LI, Y.; LI, P.; LI, P.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food Chemistry*, v. 112, p. 454–460, 2009.

LOMOLINO, G.; ZOCCA, F.; SPETTOLI, P.; ZANIN, G.; LANTE, A. A preliminary study on changes in phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 575–579, 2010.

LUCENA, A. P. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; MACIEL, J. A. C.; TAVARES, J. X.; BARBOSA-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, E. J. Antioxidant activity and phenolics content of selected Brazilian wines. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 30–36, 2010.

MAJO, D. D.; GUARDIA, M. L.; GIAMMANCO, S.; NEVE, L. L.; GIAMMANCO, M. The antioxidant capacity of red wine in relationship with its polyphenolic constituents. **Food Chemistry**, v. 111, p.45–49, 2008.

MESSIAS, C. IAC e Unicamp buscam uva e vinho representativos de SP. **Jornal de UNICAMP**, Campinas, 12-25, Nov. 2007.

MOURE, A. S; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUES, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUES, H.; NÚNES, M. J.; PARAJ', J. C. Review - Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

RIZZON, L. A., MIELE, A., MENEGUZZO, J. Efeito da relação das fases líquida e sólida da uva na composição química e na característica sensorial do vinho Cabernet. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n. 3, 1999.

ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P.; GKOULIOTI, A.; MARINOS, V.; TSOUPEIS, D.; BOUTARIS, I. Antioxidant activities of some Greek

wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis** (2008), doi:10.1016/j.jfca.2008.02.011.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654–658, 2009.

SHI, J.; JIANMEL, Y.; POHORLY, J. E.; KAKUDA, Y. Polyphenolics in Grape Seeds - Biochemistry and Functionality. **Journal of medicinal food**, v. 6, n. 4, p. 291-299, 2003.

SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, n. 2, p.62-69, 1965.

SIPGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M de. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200–208, 2007.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; 4, FETT, R. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUZA, A. V.; LIMA, G. P. P.; VIETES, R. L. Avaliação nutricional de diferentes variedades de uva (*Vitis* sp.). **Naturalia**, v.33, p. 100-109, 2010.

SOVAK, M. D. M. Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. **Journal of medical food**, v. 4, n. 2, p. 93-105, 2001.

TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; PETTINELLI JR., A.; POMMER, C. V.; SABINO, J. C.; PASSOS, I. R. S.; COELHO, S. M. B. M.; SILVA, A. C. P da; RIBEIRO,

J. A. Produtividade de cultivares IAC de uvas para vinho como produtores diretos e sobre diferentes porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 345-362, 1990.

VÁZQUEZ, E. S.; SEGADE, S. R.; FERNÁNDEZ, I. O. Effect of the winemaking technique on phenolic composition and chromatic characteristics in young red wines. **European Food Research and Technology**, v. 231, p. 789–802, 2010.

XIA, E.; DENG, G.; GUO, Y.; LI, H. Review: Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 622-646, 2010.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 41-48, 2006.

CAPÍTULO 3

FENÓLICOS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ETAPAS DO PROCESSAMENTO DO VINHO ELABORADO COM A UVA MÁXIMO IAC 138-22

Joyce Pellisson Pereira¹, Marcelo Alexandre Prado¹, Marta Cristina Teixeira Duarte²

¹Laboratório de Análises de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

²Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

RESUMO

A uva Máximo IAC 138-22 apresenta uma boa maturação e desenvolvimento de taninos com elevado grau Brix, produzindo um vinho de qualidade superior aos produzidos no estado de São Paulo. Durante a vinificação os componentes da uva, inclusive compostos fenólicos, são transferidos para o mosto, sendo responsáveis pelas características organolépticas do vinho, além de serem atribuídos a diversas atividades biológicas. A atividade antimicrobiana tem especial importância diante da crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos conhecidos, além da preocupação atual de se substituir os aditivos sintéticos. Neste trabalho as amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, sementes, três etapas da vinificação (mosto) e resíduos do processo foram extraídas em etanol:água (1:1 v/v) e em acetona:água (1:1 v/v) e submetidas a evaporador rotativo, assim como o vinho, sendo os extratos secos avaliados em relação ao conteúdo fenólico total e utilizados na determinação da concentração inibitória mínima (MIC) frente a bactérias Gram (+), Gram (-) e levedura *C. albicans*. Todas as amostras inibiram ao menos dois dos micro-organismos estudados e cerca de 68 % apresentaram atividade contra seis ou mais micro-organismos, sendo as Gram (+) mais sensíveis que as Gram (-). *B. cereus* foi o micro-organismo mais sensível, seguida por *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhimurium*. A levedura *C. albicans* foi inibida pelos extratos de sementes a baixas concentrações, o que pode estar relacionado ao teor de fenólicos totais elevado. *P. aeruginosa* foi inibida apenas por extratos de mosto, vinho e resíduos, o que pode estar relacionado à formação de fenólicos durante a vinificação. Um aumento do conteúdo fenólico nas fases do mosto foi acompanhado por um aumento da capacidade antimicrobiana dos extratos. O vinho apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram (+) e

Gram (-) avaliadas e os resíduos da vinificação apresentaram elevado teor de fenólicos e atividade antimicrobiana considerável, o que sugere a possibilidade de seu reaproveitamento.

Palavras-chave: compostos fenólicos, uva Máximo IAC 138-22, mosto, resíduos, vinho, MIC.

ABSTRACT

Máximo IAC 138-22 grape has a good maturity and development of tannin with high Brix, producing a wine of superior quality compared to others produced in the state of São Paulo. During winemaking, grape components, including phenolics compounds, are transferred to the must, and are responsible for the organoleptic characteristics of wine, and are assigned to various biological activities. Antimicrobial activity is of particular importance because of resistance of microorganisms to antibiotics, beyond the current concern to replace synthetic additives. In this work, samples of Máximo IAC 138-22 grape, skin, pulp, seeds, three stages of winemaking (must) and wastes were extracted in ethanol:water (1:1 v/v) and in acetone:water (1:1 v/v) and they were dried in a rotary evaporator, as well as the wine. Dried extracts were evaluated for total phenolic content and for determining the minimum inhibitory concentration (MIC) against Gram (+), Gram (-) and *C. albicans*. All strains inhibited at least two microorganisms studied and about 68 % showed activity against six or more microorganisms and Gram (+) were more sensitive. *B. cereus* was the most sensitive, followed by *E. coli*, *S. aureus* and *S. typhimurium*. The yeast *C. albicans* was inhibited by extracts of seeds at low concentrations, which may be related to high total phenolic content. *P. aeruginosa* was inhibited only by some extracts of must and wine, which may be related to the phenolics formed during winemaking. An increase in phenolic content in phases of the must was followed by an increase in antibacterial activity of extracts. The wine showed antimicrobial activity against all Gram (+) and Gram (-) and wastes showed a high phenolic content and antimicrobial activity, suggesting the possibility of reuse.

Key-words: phenolics compounds, Máximo IAC 138-22 grape, must, waste, wine, MIC.

1. INTRODUÇÃO

A uva Máximo IAC 138-22, obtida por Santos Neto, em 1946, no Programa de Melhoramento Genético do IAC, é resultado do cruzamento entre as variedades Seibel 11342 (híbrido) e Syrah (*Vitis vinifera*). Esta variedade caracteriza-se por plantas bastante produtivas, de ciclo curto a médio, vigorosas, com dois a três cachos (médios a grandes) por ramo e de boa resistência às doenças. As bagas têm tamanho médio, são oval-arredondadas, de coloração preto-azulada. Apresentam boa resistência a rachamentos e podridões e possuem teores médios de açúcar de 150 g/L nas regiões mais quentes. O rendimento em vinho é de cerca de 60 % (SANTOS NETO et al., 1968 apud TERRA et al., 1990).



Figura 1. Uva Máximo IAC 138-22

Atualmente, o plantio desta variedade é feito em diferentes regiões do Estado de São Paulo. Entre os municípios, destacam-se São Miguel Arcanjo, Indaiatuba, Jundiaí, Jarinu, Louveira, Vinhedo, Valinhos e Monte Alegre do Sul. Por meio do manejo do vinhedo, com a

realização de duas podas, tem-se a produção durante o inverno, quando a amplitude de temperatura, ou seja, altas durante o dia e baixas durante a noite, permite a boa maturação da uva e um bom desenvolvimento dos taninos, com elevado grau Brix – acima de 20 ° Brix – no qual a chaptalização, adição de açúcar de cana, pode ser muito reduzida, permitindo a obtenção de um vinho de graduação alcoólica de 11 ° a 12 ° GL (MESSIAS, 2007).

A vinificação é o processo de transformação do mosto da uva em vinho, caracterizado pela maceração, período em que a parte sólida da uva permanece em contato com o mosto. É durante este contato que muitos componentes da uva passam para o mosto, inicialmente por um processo de dissolução e depois por difusão. O rendimento em mosto é extremamente variável de uma cultivar a outra e, para uma mesma cultivar, aumentos importantes podem ocorrer durante a fase de maturação da uva, principalmente em consequência de precipitações pluviométricas intensas (RIZZON et al., 1999).

No processamento de vinho, os compostos da uva são transferidos para o mosto e para o vinho, que contém diversos polifenóis com diferentes graus de polimerização. Os compostos fenólicos são responsáveis pelas características organolépticas dos vinhos, além de apresentarem benefícios para a saúde, como propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antibióticas (XIA et al., 2010; GHARRAS, 2009; CUSHNIE e LAMB, 2005; JACKSON, 1994).

Os compostos fenólicos ou polifenóis são metabólitos secundários amplamente distribuídos em vegetais e cujas estruturas variam de simples moléculas (ácidos fenólicos, flavonóides) a compostos altamente polimerizados (ligninas, melaninas, taninos), sendo os flavonóides o grupo mais comum e largamente distribuído entre eles (BRAVO, 1998).

Os flavonóides são potentes antioxidantes, sequestradores de radicais e quelantes de metais, além de agirem na inibição da peroxidação lipídica. Ainda, estudos epidemiológicos têm indicado que o elevado consumo de flavonóides pode ser associado à redução de riscos de doenças crônicas, como as cardiovasculares (VAQUERO et al., 2007b).

Entre as atividades biológicas, a antimicrobiana tem especial importância diante da crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos conhecidos, o que sugere a importância na busca de novas classes de compostos antimicrobianos. Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente no uso terapêutico de produtos naturais, especialmente os derivados de plantas, que são geralmente menos potentes que os antibióticos sintéticos (RATES, 2001; CUSHNIE e LAMB, 2005; VAQUERO et al., 2007a).

Além da crescente resistência antimicrobiana de patógenos isolados de humanos e animais, a crescente conscientização dos consumidores sobre as substâncias químicas utilizados como conservantes de alimentos, demonstra a necessidade de investigação de mais antimicrobianos com menos efeitos colaterais na saúde humana (PAPADOPOULOU et al., 2005).

Além do uso terapêutico dos compostos antimicrobianos, estes são ainda importantes para a preservação dos alimentos. Os micro-organismos possuem efeitos desfavoráveis na qualidade, segurança e tempo de prateleira dos alimentos. Segundo Baydar et al. (2004), o uso de aditivos sintéticos é um dos meios utilizados para prevenir essa deterioração, entretanto, o uso de extratos vegetais com esta função tem aumentado, principalmente de ervas e especiarias.

Apesar das técnicas de preservação de alimentos disponíveis, ainda não há controle total da contaminação de alimentos e da deterioração por micro-organismos. Uvas, vinhos e

resíduos da vinificação contêm uma grande variedade de compostos fenólicos, que podem ser extraídos com etanol aquoso (PESCHEL et al., 2006) e utilizados como antimicrobianos naturais. Os compostos fenólicos podem afetar o crescimento e metabolismo de bactérias, de acordo com sua constituição e concentração (VAQUERO et al., 2007b).

As cascas das uvas são fontes ricas de compostos fenólicos, tanto flavonóides quanto não-flavonóides. Resultados obtidos por Serra et al. (2008) indicam que extratos naturais contêm um potencial antimicrobiano contra diversos micro-organismos superior aos compostos isolados.

Durante o processamento do vinho, ocorre a extração hidroalcoólica dos compostos fenólicos, tanto qualitativa quanto quantitativamente limitante, sendo, portanto, difícil a obtenção de uma extração completa e controlada da uva para o mosto do vinho (SOVAK, 2001). Deste modo, os resíduos da vinificação contêm elevados teores de fenólicos totais com atividades biológicas e poderiam substituir antioxidantes sintéticos, visto que apresentariam baixos custos e a possibilidade de redução de problemas ambientais com seu descarte (MOURE et al., 2001).

Vários estudos têm demonstrado a possibilidade de o consumo de vinho proteger os indivíduos de doenças infecciosas de origem alimentar. Isto porque o vinho apresenta diversas propriedades, como a presença de etanol, pH ácido e elevados níveis de compostos orgânicos, ácidos, dióxido de enxofre (subproduto natural do metabolismo da levedura, que pode ainda ser adicionado durante o processo de vinificação) e fenólicos, que podem ter uma ação antimicrobiana (FERNANDES et al., 2007; WAITE e DAESCHEL, 2007).

Os principais ácidos presentes no vinho são o tartárico, o málico e o lático. Os ácidos orgânicos são conhecidos por possuírem propriedades antimicrobianas, mas sua eficácia

depende da sua concentração, do nível de dissociação e do pH (ULJAS e INGHAM, 1999). A maioria dos vinhos geralmente tem um pH na faixa de 3,0 a 4,0. O pH tem uma influência considerável sobre a eficácia dos compostos antimicrobianos. Um pH muito baixo pode causar a perda da função de enzimas de micro-organismos, entretanto, apenas este fator não garante a total esterilização (ULJAS e INGHAM, 1999; KOBAYASHI et al., 2000).

Diversos métodos são utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana. Os testes de disco-difusão são baseados na presença de um halo de inibição, cujo diâmetro deve ser correlacionado aos valores de concentrações inibitórias mínimas (MIC) de cepas reconhecidamente sensíveis e resistentes a diversos agentes antimicrobianos. O halo de inibição deve ser considerado a área sem crescimento detectável a olho nu (CLSI, 2003).

A metodologia do teste de sensibilidade antimicrobiana por diluição em ágar é uma técnica em que o agente antimicrobiano é incorporado ao meio ágar, sendo que cada placa contém uma concentração diferente do agente. Este método é denominado microdiluição, porque envolve o uso de pequenos volumes de caldo em placas de ELISA. A MIC é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos (para a técnica de macrodiluição) ou poços (para técnica de microdiluição) conforme detectado a olho nu (CLSI, 2005).

Não existem dados disponíveis na literatura que façam referências para estas análises em relação à uva Máximo IAC 138-22 e ao vinho produzido a partir dela. Estes conhecimentos são úteis para os consumidores que buscam os benefícios do vinho para a saúde e para os produtores que procuram agregar valor de mercado a seus produtos. Como este projeto se insere num contexto de preocupação com os resíduos do processamento dos vinhos,

serão avaliadas estas propriedades dos resíduos, visando possíveis aplicações em indústrias de alimentos como antibióticos naturais.

Diante disso, este trabalho teve como objetivo quantificar os compostos fenólicos de extratos obtidos com diferentes soluções extratoras (etanol:água 1:1 v/v e acetona:água 1:1 v/v) da uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, de três etapas da vinificação do vinho artesanal produzido com esta uva e de dois resíduos gerados neste processamento. Estas amostras também foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana pelo método de determinação da concentração mínima inibitória (MIC) por microdiluição.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Análises de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) e na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP.

2.1. AMOSTRAS

Foram avaliadas amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa e semente, três estágios da vinificação, denominados como mosto inicial, mosto intermediário e mosto final, dois resíduos do processamento do vinho, denominados como primeiro e segundo resíduos, e o vinho obtido deste processo. A figura 2 apresenta o processo de obtenção das amostras.

Dois quilogramas de uva Máximo IAC 138-22 foram obtidos em uma propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP e congelados no dia da colheita, em 21 de janeiro de

2009. Porções da uva foram descongeladas de acordo com a necessidade e as cascas, polpas e sementes da uva foram posteriormente separadas e avaliadas quanto à composição fenólica total e à atividade antioxidante. As amostras de mosto, resíduos e o vinho foram obtidos artesanalmente em uma propriedade localizada na cidade de Valinhos/SP, que produz o vinho a partir das uvas obtidas na mesma propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP. A produção anual de vinho deste produtor é de aproximadamente 180 litros.

As uvas foram esmagadas em 22 de janeiro de 2009, sendo adicionado ao mosto 30 g de levedura, 30 g de nutriente e 10 g de dióxido de enxofre. O tempo de maceração foi de três dias. No segundo dia, foi retirado um litro do mosto para análise, denominado como mosto inicial, e a primeira amostra de resíduo (dois quilogramas). No terceiro dia, foi realizada a primeira trasfega, retirando-se cascas, sementes e borra, sendo obtido o segundo resíduo (dois quilogramas).

Em seguida, o produto foi armazenado em tanques fechados apenas com respiro e em 06 de março de 2009 foi realizada a segunda trasfega, sendo retirado um litro de mosto, que foi denominado como mosto intermediário. Nesta etapa, foi verificada uma graduação alcoólica de 8,9 ° GL, sendo esta corrigida para 10° GL pela adição de quatro litros de álcool vínico, além de 20 g de dióxido de enxofre. Em 8 de abril de 2009 foi realizada a terceira trasfega, sendo retirado um litro de mosto, denominado como mosto final. Em 4 de agosto de 2009 foram realizadas a quarta trasfega e a adição de 2 g de dióxido de enxofre. O vinho foi engarrafado e mantido por quatro a seis meses nestas condições antes do consumo. O vinho analisado neste trabalho foi mantido nestas condições por 15 meses. Todas as amostras, exceto o vinho, foram congeladas a -20 ° C até a extração.

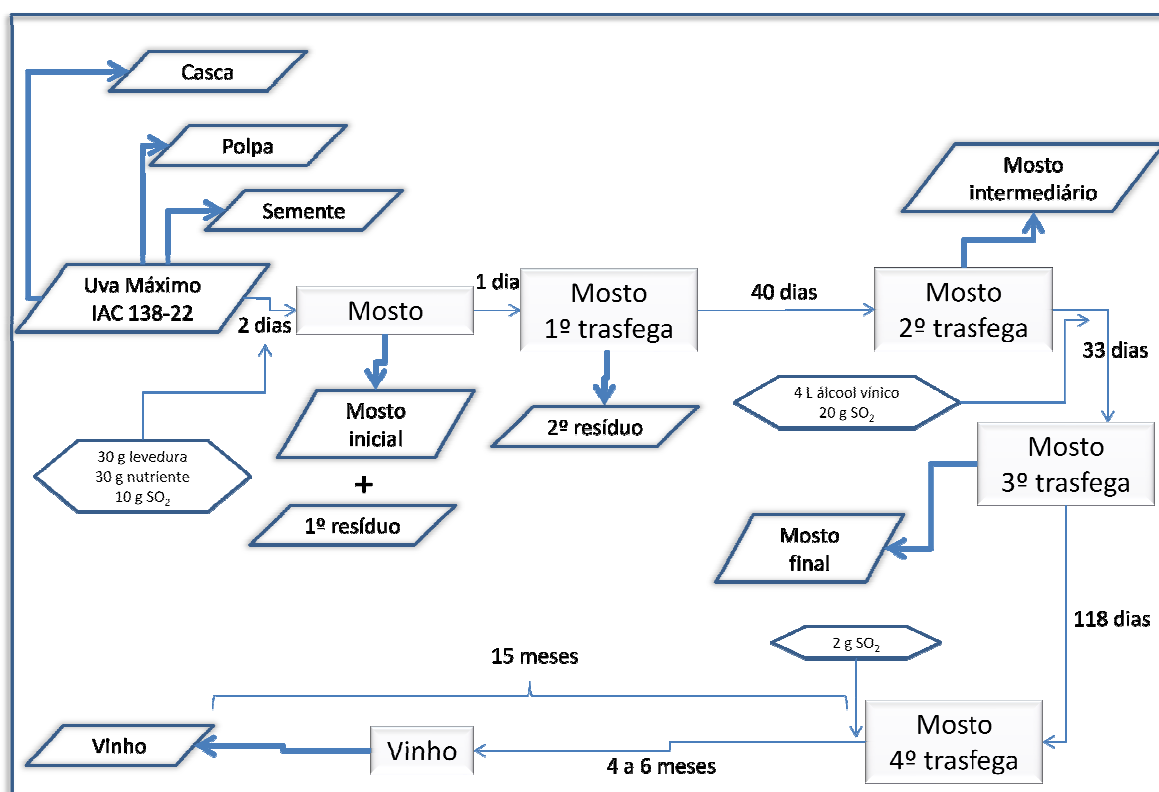


Figura 2. Processo de obtenção das amostras. Legenda: amostras analisadas neste trabalho; etapas do processo; adição de componentes necessários para a vinificação.

2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA E ÁLCOOL DAS AMOSTRAS

As amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, mosto inicial, mosto intermediário, mosto final, resíduos e vinho foram submetidas à secagem em estufa a vácuo a temperatura de 40 °C a 50 °C até a obtenção de peso constante (Instituto Adolfo Lutz, 2005). O teor de umidade das amostras de uva, casca, polpa e semente foi calculado pela razão entre a massa de água contida na amostra e massa de amostra úmida, sendo expresso em porcentagem. O teor de água mais álcool das amostras de mosto inicial, mosto intermediário, mosto final e vinho foi calculado pela razão entre a massa de água mais álcool contida nas amostras e a massa de amostra úmida, sendo expresso em porcentagem.

2.3. EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS

A extração dos compostos fenólicos foi realizada pela metodologia de Scherer e Godoy (2009) adaptada. As amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, mosto e resíduos foram maceradas e submetidas à extração em uma solução etanol:água (1:1 v/v) em uma proporção 1:10 (m/v ou v/v) amostra:solvente, com agitação no escuro e a temperatura ambiente por 80 minutos e, em seguida, à filtração a vácuo. O resíduo sólido foi re-extraído pelo mesmo método descrito acima. Os dois extratos obtidos foram misturados e o solvente evaporado em evaporador rotativo (38 °C a 150 rpm) até a obtenção de extrato seco, denominado por “I”. Todas as amostras foram também submetidas à extração em uma solução acetona:água (1:1 v/v) em uma proporção 1:10 (m/v ou v/v) amostra:solvente pela metodologia descrita acima. Neste caso, o extrato seco foi denominado por “II”. A amostra de vinho foi submetida à agitação no escuro e a temperatura ambiente por 160 minutos e, em seguida, à filtração a vácuo, sem a adição de solvente. A Figura 3 apresenta o processo de obtenção dos extratos.

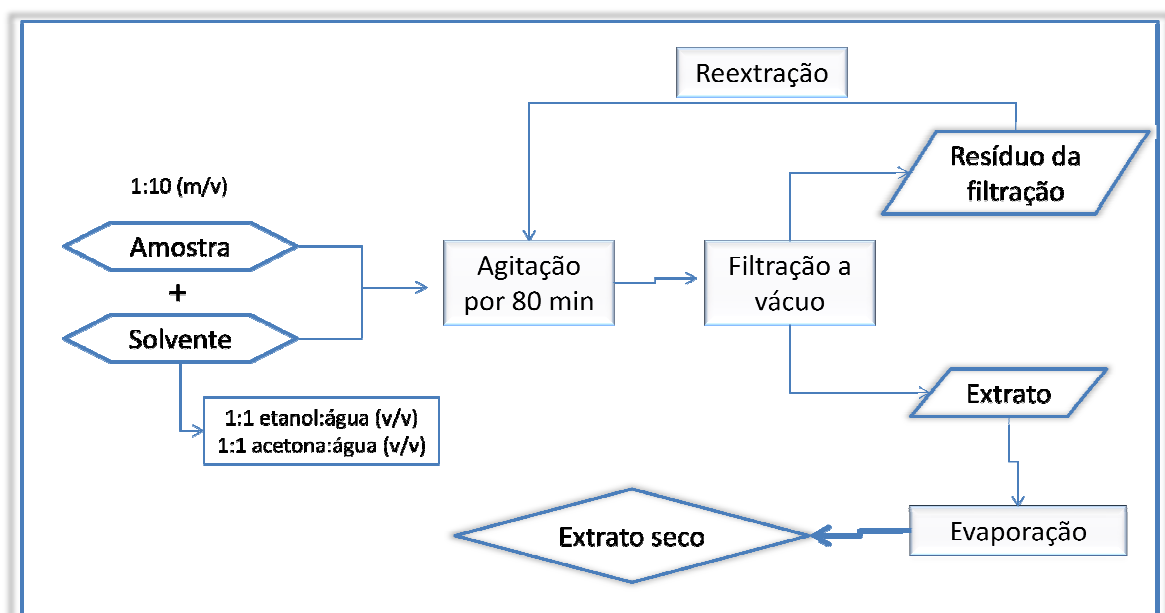






Figura 3. Processo de obtenção dos extratos. Legenda:  amostras obtidas no processo de extração;  etapas do processo;  amostra e solvente;  extrato final usado nas análises.

2.4. FENÓLICOS TOTAIS

O conteúdo de fenólicos totais das amostras de uva, mosto, vinho e resíduos foi determinado pelo método espectrofotométrico com reagente Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão (SINGLETON e ROSSI, 1965). Foi feita uma curva de calibração do ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco (mg EAG/g extrato) para todas as amostras. Os extratos secos foram diluídos em solução etanol:água (1:1 v/v) em concentrações conhecidas para as análises de compostos fenólicos totais. Uma alíquota de 0,5 mL de amostra foi adicionada a 2,5 mL de Folin-Ciocalteu 10 % em água destilada. Após 5 minutos de reação, foram adicionados 2,0 mL de carbonato de sódio 7,5 %. A absorbância a 740 nm em espectrofotômetro (UV 1600, Pró-Análise) foi medida após 2 horas de reação na ausência de luz.

2.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

2.5.1. MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados na determinação da atividade antimicrobiana de todos os extratos foram os Gram (+) *Bacillus subtilis* ATCC 2576, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, os Gram (-) *Escherichia coli* ATCC 11775, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13388 e *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 e a levedura *Candida albicans* ATCC 10231. Os micro-organismos foram obtidos junto à Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”.

2.5.2. MEIOS DE CULTURA

As bactérias foram mantidas em meio Nutriente Agar (Merck) e a levedura em meio Agar Sabouraud Dextrose (Merck). Para os testes de atividade antimicrobiana, os extratos secos foram diluídos nos meios de cultura Caldo Mueller-Hinton (Difco), para os testes com bactérias e caldo RPMI-1640 (Cultlab), para os testes com *Candida albicans*, contendo 2,5 % de DMSO (Synth) – dimetilsulfóxido.

2.5.3. PADRONIZAÇÃO E PREPARO DE INÓCULO

Os inóculos dos micro-organismos foram preparados transferindo-se células dos tubos de manutenção para frasco contendo solução salina (Synth) 0,9 %, esterilizada. A concentração da suspensão inicial de células foi padronizada para uma densidade óptica correspondente a D.O. 0,5 da escala de McFarland, em espectrofotômetro, ou seja, para uma

absorbância entre 0,08 a 0,1 a 625 nm, no caso das bactérias ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL) e a 530 nm, no caso da levedura *C. albicans* ($5,0 \times 10^6$ UFC/mL). Em seguida as suspensões de células foram diluídas adequadamente nos meios de cultura, de modo a proporcionar um inóculo correspondente a $5,0 \times 10^5$ UFC/mL (bactérias) e $2,5 \times 10^3$ (levedura), em cada compartimento da microplaca de ELISA utilizada nos testes de determinação da atividade antimicrobiana.

2.5.4. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) PELO MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO (CLSI, 2002; CLSI, 2005)

A determinação da MIC foi realizada conforme a técnica de microdiluição em placas esterilizadas de 96 orifícios. Em cada orifício foram adicionados o meio de cultivo contendo o extrato fenólico das amostras, em concentrações conhecidas. Em seguida foi adicionada a suspensão microbiana e a placa incubada a 36 °C por 24 h. No caso das bactérias, após este período foi adicionado o revelador 2,3,5-cloreto de trifetil tetrazolium (Merck) e a placa re-incubada por 3 h na mesma temperatura. A MIC foi considerada a menor concentração do extrato seco capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. No caso da *C. albicans*, a avaliação do crescimento foi verificada pela mudança de coloração do meio RPMI-1640 de rosa para amarelo (DUARTE et al., 2005).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta o teor de umidade para as amostras de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa e semente e a tabela 2 o teor de água mais álcool das amostras de mosto inicial, mosto intermediário, mosto final, resíduos e vinho.

A baga da uva é formada em geral por 6 a 12 % de casca, 2 a 5 % de semente e 85 a 92 % de polpa, sendo esta última constituída de 65 a 85% de água e de 12 a 25 % de açúcares redutores (SOUZA et al., 2010). A uva Máximo IAC 138-22 apresentou cerca de 78,58 % de umidade e a polpa 82,46 %. Em relação à variedade, colheita e grau de maturação da uva, o teor de umidade está compreendido entre 65 a 94 %. A água serve de veículo e de solvente às diversas matérias elaboradas pela uva e é o único constituinte líquido do mosto (SOUZA et al., 2010). Entre as amostras, a semente apresentou o menor teor de umidade (cerca de 30,79 %).

Tabela 1: Teor de umidade.

Amostra	Teor de água (%)
Uva	78,58 ± 0,83
Polpa	82,46 ± 0,17
Casca	78,62 ± 0,24
Semente	30,79 ± 0,70

Tabela 2: Teor de água e álcool.

Amostra	Teor de água + álcool (%)
Mosto inicial	85,99 ± 0,04
Mosto intermediário	90,55 ± 0,12
Mosto final	92,54 ± 0,23
1º resíduo	63,24 ± 0,80
2º resíduo	79,90 ± 0,80
Vinho	95,68 ± 0,15

Os rendimentos das extrações I e II foram calculados e estão apresentados na Tabela 3. Os maiores teores de rendimento foram verificados para as amostras como a uva, casca e polpa, provavelmente devido ao elevado teor de açúcar. Isto ocorre porque os solventes

alcoólicos são responsáveis por uma extração não seletiva com alto rendimento (SPIGNO et al., 2007). Extrações hidroalcoólicas de amostras de frutas ou subprodutos geram extratos com elevadas quantidades de açúcares e polissacarídeos, que podem ser purificados através de colunas C-18, por exemplo, eliminando-se açúcares, ácidos não voláteis e aminoácidos. Extratos purificados apresentam maiores teores de fenólicos, entretanto, este é um processo caro e que inevitavelmente elimina polifenóis. Além disso, em algumas aplicações industriais de extratos, a remoção de açúcar não é necessária (SPIGNO et al., 2007).

Tabela 3: Porcentagem de rendimento das extrações I e II*

Extratos	Rendimento da extração (%)	
	Amostra I	Amostra II
Polpa	17,16 ± 1,45 ^{cd}	19,78 ± 0,11 ^b
Casca	15,07 ± 0,01 ^{de}	12,66 ± 0,44 ^f
Semente	6,99 ± 0,13 ^{hi}	10,14 ± 0,39 ^g
Uva	17,34 ± 1,48 ^c	22,46 ± 1,55 ^a
Mosto inicial	13,47 ± 0,48 ^{ef}	12,55 ± 0,12 ^f
Mosto intermediário	2,25 ± 0,26 ^l	3,40 ± 0,08 ^{kl}
Mosto final	3,70 ± 0,37 ^{kl}	3,62 ± 0,02 ^{kl}
1º resíduo	7,38 ± 0,32 ^h	8,53 ± 0,88 ^{gh}
2º resíduo	3,10 ± 0,71 ^{kl}	5,22 ± 0,11 ^{ij}
Vinho**	4,38 ± 0,09 ^{jk}	

As letras indicam rendimentos com valores estatisticamente distintos pelo método de Tukey.

*Amostra I refere-se a extratos obtidos em solução etanol:água (1:1 v/v) e amostra II refere-se à extratos obtidos em solução acetona:água (1/1 v/v). ** A extração do vinho foi realizada sem a adição de solvente.

De acordo com Gan e Latiff (2011), a acetona promove um maior rendimento de fenólicos que o etanol, metanol, acetato de etila e hexano, o que não foi aplicável para as amostras analisadas neste trabalho, em não houve diferença entre as extrações para a maioria

das amostras (Tabela 3). Em trabalho realizado por Lafka et al. (2007), o extrato hidroalcoólico apresentou o maior teor de fenólicos. Extrações hidroalcoólicas são ainda mais eficientes que o próprio solvente puro, sendo o etanol o mais utilizado, por ser um solvente polar e responsável pela extração de flavonóides e seus glicosídeos, catecóis e taninos de matérias vegetais (LOMOLINO et al., 2010)

Em estudo realizado por Spigno et al. (2007) foi verificado que o rendimento de fenólicos foi aumentado com a elevação da quantidade de água na porcentagem de etanol de 10 para 30 %. Entretanto, não houve mudança significativa na extração quando avaliada concentração de água em etanol de 30 a 60 %. Yilmaz e Toledo (2006) demonstraram que o conteúdo fenólico de extratos etanólicos de sementes de uva se elevou com o aumento da concentração de água de 0 a 30 %, mas se manteve constante em 30, 40 e 50 % e diminuiu com concentrações elevadas.

A quantificação de fenólicos totais pelo método espectrofotométrico com reagente Folin-Ciocalteu, utilizando ácido gálico como padrão foi realizada para todos os extratos. A Figura 4 apresenta a reta padrão do ácido gálico, utilizada para os cálculos do conteúdo de fenólicos totais em mg de equivalente em ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g de extrato).

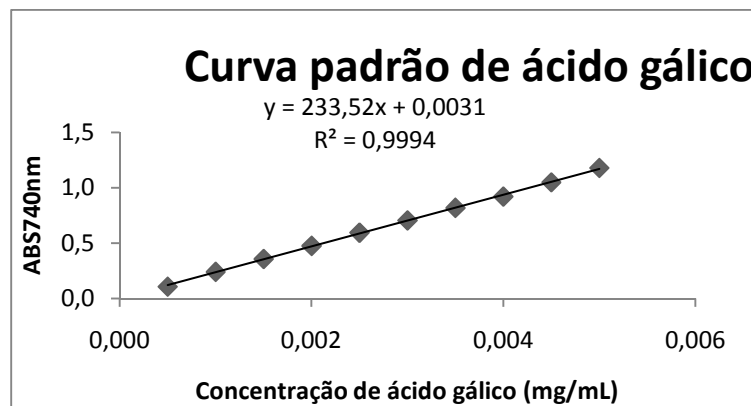


Figura 4: Curva de calibração de ácido gálico pelo método de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965).

Os resultados da quantificação de fenólicos totais determinados para todas as amostras em triplicata estão apresentados na Tabela 4. Estes resultados foram submetidos ao teste estatístico pelo método de Tukey, sendo possível aferir que não houve diferença estatística entre as extrações I e II para as amostras de polpa, casca, uva, mostos inicial, intermediário e final, e segundo resíduo da vinificação. Entretanto, o extrato da semente obtido com a solução etanol:água (1:1 v/v) apresentou maior teor de fenólicos totais que o extrato obtido em acetona:água (1:1 v/v).

As amostras de polpa, uva Máximo IAC 138-22 e mosto inicial apresentaram os menores teores de fenólicos totais, como pode ser observado na Tabela 4. Não houve diferença entre a quantidade de fenólicos observada nos extratos de mosto intermediário, mosto final e vinho. Os extratos de ambos os resíduos apresentaram conteúdo elevado de fenólicos, demonstrando que não houve a completa extração dos compostos da uva para o mosto durante a vinificação deste vinho. Assim, verificou-se que os resíduos poderiam permanecer por mais tempo em contato com o mosto, visando a produção de um vinho com maior conteúdo de fenólicos e possivelmente com maior atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana dos extratos obtidos a partir das diferentes amostras de Uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente, três etapas do mosto, dois resíduos e vinho foi avaliada frente a bactérias Gram (+), Gram (-) e frente à levedura *C. albicans*. Os resultados de concentração mínima inibitória – MIC, expressos em mg/mL, estão apresentados na Tabela 4, e correspondem à duplicata de cada amostra, ou seja, resultados obtidos de duas extrações. Para os resultados referentes a dados de MIC que diferiram para as duplicatas analisadas estão apresentados os valores de cada duplicata, por exemplo, MIC 9,0; 10,0 (uva em etanol para *B. cereus* - Tabela 4). No caso de valores de MIC idênticos para as duplicatas foram mantidos os dados unitários (MIC 8,0 – uva em acetona para *B. cereus*). Isto porque em cerca de 37,5 % dos casos foram observados valores discrepantes para as duplicatas das amostras, como no mosto final extraído em etanol que quando avaliado em relação a *P. aeruginosa* apresentou valores de MIC de 4,0 mg/mL e >10,0 mg/mL para as duplicatas.

Estes valores discrepantes podem ser resultantes de diversos fatores. As amostras em análise são heterogêneas e, portanto, diferentes alíquotas nem sempre terão o mesmo perfil químico. As diferenças nos resultados representam as características reais das amostras e indicam esta heterogeneidade, que acarretou na variação de atividade antimicrobiana.

Além disso, após secagem dos extratos em evaporador rotativo foram observadas diferenças quanto à viscosidade das duplicatas, o que pode ter incorrido em variações na composição das amostras. No entanto, tal variação não foi significativa em relação ao conteúdo total de fenólicos para as amostras, exceto para as sementes, cuja extração em etanol resultou em um conteúdo superior, quando comparado à extração em acetona (Tabela 4).

Fatores relacionados à metodologia empregada para determinação da atividade antimicrobiana podem também influenciar nos resultados, como a interação da amostra com o

meio de cultura empregado nos testes, problemas com a solubilidade das amostras ou até mesmo a cor dos extratos (Liu et al. , 2007). Outro fator que pode contribuir para a diferença entre os resultados é a precipitação de flavonóides, que pode diminuir o contato entre os micro-organismos e o substrato (CUSHNINE e LAMB, 2005).

Tabela 4: Fenólicos totais (mg EAG/g de extrato) e concentração mínima inibitória – MIC, expressos em mg/mL dos extratos secos.

		Bactérias Gram (+)			Bactérias Gram (-)				Levedura
AMOSTRAS**	Fenólicos totais (mg EAC/g de extrato)	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>C. albicans</i>
Uva I	12,83 ± 0,67 ^f	*	9,0; 10,0	*	*	*	*	2,5; 5,0	*
Uva II	14,84 ± 0,57 ^f	*	8,0	10,0; *	*	*	*	*	*
Polpa I	3,86 ± 0,10 ^f	*	10,0	*	10,0; *	*	*	*	*
Polpa II	3,81 ± 0,17 ^f	*	*	*	*	*	*	*	*
Casca I	55,79 ± 6,83 ^d	9,0; *	2,5; 3,0	6,0	2,5; 5,0	7,0; 10,0	*	7,0; 9,0	*
Casca II	58,79 ± 7,22 ^d	7,0; 9,0	3,0; 4,0	5,0	4,0; 5,0	5,0; 8,0	*	7,0	*
Semente I	136,40 ± 5,29 ^a	*	2,0; 2,5	2,5	2,0; 5,0	3,0; 4,0	*	7,0; 8,0	0,001
Semente II	120,67 ± 6,82 ^b	10,0; *	3,0; 5,0	5,0; 10,0	2,5; 5,0	4,0; 10,0	*	7,0; 8,0	0,001; 0,002
Mosto inicial I	3,72 ± 0,34 ^f	*	10,0	*	10,0; *	*	*	*	*
Mosto inicial II	5,10 ± 0,46 ^f	7,0; *	5,0; *	4,0; *	3,0; *	10,0; *	*	6,0; *	*
Mosto interm. I	39,23 ± 2,10 ^e	5,0	3,0; 3,5	5,0	2,5	7,0	5,0	7,0; 9,0	*
Mosto interm. II	32,76 ± 0,49 ^e	5,0; 6,0	3,0	5,0	2,5; 5,0	6,0; 7,0	4,0	8,0; 9,0	*
Mosto final I	35,30 ± 1,02 ^e	6,0	2,5; 3,0	4,0; 5,0	1,75; 2,0	6,0	4,0; *	8,0; 9,0	*
Mosto final II	30,45 ± 1,52 ^e	10,0	3,0; 5,0	4,0; 5,0	2,0; 5,0	6,0	3,0; 5,0	7,0; 9,0	*
1º resíduo I	67,33 ± 1,08 ^{cd}	*	3,0	5,0	3,0	*	*	5,0	*
1º resíduo II	72,85 ± 5,62 ^c	8,0; *	1,75; 3,0	2,5; 3,0	2,5; 3,0	*	10,0; *	6,0	*
2º resíduo I	78,47 ± 2,34 ^c	7,0; *	1,75; 3,0	2,0; 1,5	3,0	10,0; *	6,0; 10,0	6,0	*
2º resíduo II	74,42 ± 7,34 ^c	6,0	2,5	2,5	2,5	8,0	5,0	6,0	*
Vinho	41,43 ± 0,62 ^e	7,0	3,5	6,0	5,0	8,0	10,0	10,0	*

*valores de MIC > 10,0 mg/mL

**Amostra I refere-se a extratos obtidos em solução etanol:água (1:1 v/v) e amostra II refere-se a extratos obtidos em solução acetona:água (1:1 v/v).

De acordo com os dados da Tabela 4, todas as amostras inibiram ao menos dois dos micro-organismos estudados, tendo sido observada ação tanto contra bactérias Gram (+) como contra Gram (-). Entretanto, aproximadamente 68 % das amostras apresentaram atividade antimicrobiana contra seis ou mais micro-organismos, com exceção da polpa II, que não apresentou atividade e continha também baixo teor de fenólicos totais.

Em relação à suscetibilidade das bactérias frente aos extratos analisados, *B. cereus* foi a bactéria mais sensível, tendo sido inibida por todos os extratos a valores de MIC que variaram entre 1,75 mg/mL e 10,0 mg/mL, exceto pelo extrato em acetona de polpa de uva Máximo IAC 138-22. A maioria dos extratos foi também capaz de inibir *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhimurium*.

Ação específica sobre a levedura *C. albicans* foi observada para os extratos obtidos de sementes, que apresentaram forte atividade anti-*Candida*, inibindo a levedura a baixas concentrações (0,001 a 0,002 mg/mL), que poderiam ser utilizados para a produção de antibióticos contra este patógeno. Segundo Dasilva et al. (1991) e Prierur et al. (1994), sementes de uva possuem dímeros e trímeros de epicatequina, metabólitos secundários com alta atividade antimicrobiana, inclusive contra patógenos de alimentos.

Corrales et al. (2009) verificaram um efeito favorável na aplicação de extratos de sementes de uva em filmes de amido de ervilha utilizados para cobrir carnes, devido à atividade antimicrobiana destes extratos. Os extratos de sementes de uva Máximo IAC 138-22 avaliados neste trabalho também apresentaram atividade contra bactérias Gram (+) e Gram e seu uso poderia aumentar do período de prateleira dos alimentos.

Os extratos de sementes apresentaram atividade antimicrobiana contra todos os micro-organismos avaliados, exceto *P. aeruginosa* para ambos os extratos e *B. subtilis* para o extrato em etanol. Esta atividade pode estar relacionada aos teores elevados de

fenólicos totais, ou seja, 136,401 mg EAG/g de extrato hidroalcoólico (I) e 120,670 EAG/g de extrato em acetona (II). Estes resultados são importantes diante da busca de extratos naturais com atividade antibiótica visando a substituição dos promotores de crescimento em ração animal (ROTAVA et al., 2009).

Em relação ao mecanismo de ação foi demonstrado que compostos fenólicos podem penetrar na membrana semipermeável das bactérias, onde reagem com o citoplasma ou com as proteínas celulares (CORRALES et al., 2009). Além disso, os ácidos hidroxicinâmicos e ésteres presentes nas sementes são menos polares que os ácidos hidroxibenzóicos correspondentes, o que facilita o transporte pela membrana celular. As sementes contêm ainda elevadas quantidades de taninos, que podem inibir as enzimas extracelulares dos micro-organismos. Outro fator é a complexação de íons metálicos do meio de crescimento bacteriano, o que poderia ser um mecanismo para suas propriedades antimicrobianas.

Ainda segundo Corrales et al. (2009), a presença de metabólitos secundários em extratos de sementes é responsável pelo efeito inibitório em Gram (+), já que a parede lipídica de Gram (-) seria uma barreira para a entrada de polifenóis no citoplasma, portanto nenhuma inibição é alcançada. Entretanto, neste trabalho foi observada atividade antimicrobiana contra os Gram (-) *E. coli*, *S. enteritidis* e *S. typhimurium* para extratos obtidos em etanol e acetona. Nossos resultados estão de acordo com os obtidos por Jayaprakash et al. (2003), em que extratos de sementes de uva inibiram o crescimento de *E. coli* e *S. typhimurium*. Estas diferenças podem ser explicadas por diferentes métodos de extração e tipos de sementes utilizadas (CORRALES et al., 2009).

A bactéria *P. aeruginosa* não foi inibida por extratos obtidos em etanol e em acetona de uva Máximo IAC 138-22, casca, polpa, semente e mosto inicial, entretanto

os extratos de mosto intermediário, mosto final, vinho e resíduos do processamento apresentaram atividade antimicrobiana contra este micro-organismo. Diante disso, pode-se supor que os fenólicos advindos da uva não apresentam atividade contra este micro-organismo, mas fenólicos formados durante o processamento do vinho podem ter sido responsáveis pela atividade observada. Sabe-se que compostos fenólicos podem polimerizar e condensar durante o processamento e envelhecimento do vinho e produzir novas estruturas (FLAMINI, 2003). Segundo Jackson (1994), outras fontes de fenólicos nos vinhos são o metabolismo das leveduras e das bactérias lácticas e a madeira dos tonéis.

De acordo com Souza et al. (2010) as polpas de uva são constituídas de 65 a 85% de água e de 12 a 25 % de açúcares redutores. Os extratos de polpa obtidos no presente trabalho mostraram a presença de fenólicos totais, embora a atividade antimicrobiana tenha sido observada apenas para o extrato hidroalcoólico quando testado frente ao Gram (+) *B. cereus* e ao Gram (-) *E. coli*. Os resultados sugerem que a presença de fenólicos na polpa da uva Máximo IAC 138-22, cerca de 3,8 mg EAG/g de extrato para as extrações I e II, provavelmente foram extraídos a partir da casca da uva durante o processo de descongelamento das amostras, que foi inevitável para a separação das partes da uva. Além disso, os extratos da casca inibiram o crescimento de *B. cereus* e *E. coli* a valores baixos de MIC, o que reforça esta hipótese (Tabela 4).

Os extratos de casca de uva Máximo IAC 138-22 apresentaram conteúdo fenólico elevado, 55,793 mg EAG/g de extrato e 58,789 mg EAG/g de extrato para as extrações em etanol e acetona, respectivamente, e boa atividade antimicrobiana foi encontrada para a maioria das bactérias avaliadas, tanto contra Gram (+) quanto para Gram (-). Esta atividade pode estar relacionada com o conteúdo fenólico. Brown et al.

(2009) relacionaram a atividade contra o Gram (-) *H. pylori* à presença de fenólicos como quercetina, resveratrol e ácido elágico nas cascas das uvas.

Apenas os extratos de uva I, polpa I e II e mosto inicial I não apresentaram atividade contra *S. aureus* e os extratos de uva I e II e polpa II contra *E. coli*. Estes resultados são importantes visto que estas espécies são patógenos comuns envolvidos em uma variedade de infecções humanas e animais e conhecidos por apresentarem resistência a certos agentes antimicrobianos utilizados na medicina humana e veterinária (PAPADOPOULOU et al., 2005). Assim, todos os outros extratos poderiam ser utilizados para o isolamento de compostos e produção de novas drogas.

Entre as amostras de mosto é possível observar que houve um aumento do conteúdo fenólico significativo do mosto inicial (3,725 mg EAG/g extrato para a extração I e 5,095 mg EAG/g de extrato para a extração II) ao intermediário (39,232 mg EAG/g de extrato para a extração I e 32,763 mg EAG/g de extrato para a extração II) e uma estabilização nos níveis quando comparado ao mosto final (35,304 mg EAG/g extrato para extração I e 30,454 mg EAG/g extrato para extração II). Este aumento foi acompanhado por aumento da capacidade antimicrobiana, verificado por uma redução nos valores de MIC. Um perfil parecido com o do mosto final foi encontrado para o vinho, entretanto em alguns casos houve um aumento nos valores de MIC, indicando uma redução na capacidade antimicrobiana dos extratos durante o envelhecimento do vinho.

O vinho apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram (+) e Gram (-) avaliadas. Segundo Fernandes et al. (2007), os mecanismos responsáveis pela capacidade antimicrobiana exibida por vinhos não são totalmente compreendidos, entretanto, fatores como presença de etanol, pH ácido e elevados níveis de compostos orgânicos, dióxido de enxofre e fenólicos podem ser responsáveis pela ação

antimicrobiana (FERNANDES et al., 2007; WAITE e DAESCHEL, 2007). Neste trabalho, o efeito do etanol na avaliação da atividade antimicrobiana foi eliminado, visto que todo o solvente da extração foi evaporado antes da análise.

A bactéria *B. cereus* foi a mais sensível frente ao extrato de vinho, com valor de MIC igual a 3,5 mg/mL, seguida por *E. coli* e *S. aureus*, com valores de MIC de 5 mg/mL e 6 mg/mL, respectivamente. Resultado semelhante, em que a bactéria Gram (+) *S. aureus* foi mais resistente a vinho que a Gram (-) *E. coli*, foi obtido por Møretrø e Daeschel (2004).

Carneiro et al. (2008) verificaram que o consumo de vinho promoveu a redução do número de patógeno *Campylobacter jejuni* em modelo de estômago humano. No presente trabalho, o consumo de vinho Máximo pode ser associado à redução do número de bactérias *B. subtilis*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. enteritidis*, *P. aeruginosa* e *S. typhimurium*. Embora estes resultados referem-se apenas a uma avaliação *in vitro*, estes dados são importantes para os consumidores que buscam um benefício na saúde. Neste caso, estudos *in vivo* são indicados para uma conclusão definitiva.

Um vinho Máximo com atividade antimicrobiana mais forte poderia ser obtido possivelmente com um aumento do teor de fenólicos, com o aumento do período de maceração e envelhecimento do vinho em tonéis de madeira (ROUSSIS et al., 2008; JACKSON, 1994).

Elevadas atividades antimicrobianas também foram observadas para os extratos dos resíduos da vinificação. O segundo resíduo da vinificação apresentou atividade contra todas as bactérias avaliadas, enquanto que *S. enteritidis* não foi sensível a nenhum dos extratos obtidos para o primeiro resíduo. Fortes atividades foram verificadas contra *B. cereus*, *S. aureus* e *E. coli*, com valores de MIC de 1,75 mg/mL,

1,5 mg/mL e 2,5 mg/mL, respectivamente. Importante atividade também foi observada contra o Gram (-) *P. aeruginosa*, principalmente pelo extrato II do segundo resíduo do processamento, com MIC de 5,0 mg/mL.

Compostos com atividade contra este micro-organismo provavelmente foram formados durante o processamento deste vinho e incorporados aos resíduos, que são geralmente desprezados. Ainda, verifica-se que estes resíduos apresentaram elevado teor de fenólicos, variando de aproximadamente 67 a 78 mg EAG/g de extrato. O mesmo foi observado por Katalinić et al. (2010), que sugeriram que resíduos de cascas de uva poderiam ser utilizados na formulação de novos produtos alimentícios ou como aditivos.

Alguns trabalhos sugerem que as bactérias Gram (+) são mais sensíveis a extratos vegetais contendo fenólicos do que Gram (-) (CORRALES et al., 2009; PAPADOPOULOU et al., 2005; TAGURI et al., 2004; JAYAPRAKASHA et al., 2003), entretanto essa diferença não foi observada por Katalinić et al. (2010). No presente trabalho foi observado que 78,9 % dos Gram (+) e 67,1 % dos Gram (-) foram sensíveis às amostras analisadas.

As atividades antimicrobianas verificadas neste trabalho são importantes diante da crescente resistência dos micro-organismos aos antibióticos usuais, utilizados tanto no tratamento de doenças infecciosas quanto na indústria de alimentos para aumentar o tempo de prateleira dos produtos destinados à alimentação humana (BAYDAR et al., 2004), além da adição de extratos naturais com potencial antimicrobiano em ração animal, em substituição aos promotores de crescimento (ROTAVA et al., 2004).

4. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam que todas as amostras inibiram ao menos dois dos micro-organismos estudados e cerca de 68 % apresentaram atividade contra seis ou mais micro-organismos, incluindo bactérias Gram (+) e Gram (-), sendo as Gram (+) mais sensíveis.

Entre os micro-organismos avaliados, a bactéria *B. cereus* foi a mais sensível, seguida por *E. coli*, *S. aureus* e *S. typhimurium*. A levedura *C. albicans* foi inibida especificamente pelos extratos de sementes a baixas concentrações, o que pode estar relacionado ao teor de fenólicos totais elevado.

A bactéria *P. aeruginosa* foi inibida apenas por alguns extratos de mosto, vinho e resíduos, provavelmente devido à presença de fenólicos gerados durante o processamento do vinho.

Foi possível observar um aumento do conteúdo fenólico nas fases do mosto, o que foi acompanhado por aumento da capacidade antimicrobiana dos extratos.

O vinho apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias Gram (+) e Gram (-) avaliadas. Os extratos de resíduos da vinificação apresentaram elevado teor de fenólicos e atividade antimicrobiana, o que sugere a possibilidade de reaproveitamento.

5. REFERÊNCIAS

BAYDAR, N. G.; ÖZKAN, G. B.; SAĞDIÇ, O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. **Food Control**, v. 15, p. 335–339, 2004.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 317–333, 1998.

BROWN, J. C.; WANG, J.; KASMAN, L.; JIANG, X.; HALEY-ZITLIN, V. Activities of muscadine grape skin and quercetin against *Helicobacter pylori* infection in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, p. 139–146, 2010.

CLSI (2002). Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica – 2ª. Edição, M27-A2, v. 22, n. 15.

CLSI (2003). Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão – 8ª Edição, M2-A8, v. 23, n. 1.

CLSI (2005). Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico – 6ª. Edição, M7-A6, v. 23, n. 2.

CORRALES, M.; HAN, J. H.; TAUSCHER, B. Antimicrobial properties of grape seed extracts and their effectiveness after incorporation into pea starch films. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 425–433, 2009.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Review Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

DASILVA, J. M. R.; RIGAUD, J., CHEYNIER, V., CHEMINAT, A.; MOUTOUNET, M. Procyanidin dimmers from grape seeds. **Phytochemistry**, v. 30, p. 1259–1264, 1991.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; Rehder, V. L. G.; Delarmelina, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

FERNANDES, J.; GOMES, F.; COUTO, J. A.; HOGG, T. The antimicrobial effect of wine on *Listeria innocua* in a model stomach system. **Food Control**, v. 18, p. 1477–1483, 2007.

FLAMINI, R. Mass spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: Polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p. 218– 250, 2003.

GAN, C.; LATIFF, A. A. Optimisation of the solvent extraction of bioactive compounds from *Parkia speciosa* pod using response surface methodology. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1277–1283, 2011.

GHARRAS, H. E. Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 2512–2518, 2009.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos** - 4ª Edição. 1ª Edição Digital. Capítulo IV - Procedimentos e Determinações Gerais. 2005.

JACKSON, R. S. **Wine science - Principles, practice, perception**. Second edition. Academic Press: California, USA, 1994. 648 p.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Research International**, v. 36, p. 117-122, 2003.

KATALINIĆ, V.; MOŽINA, S. S.; SKROZA, D.; GENERALIČ, I.; ABRAMOVIČ, H.; MILOŠ, M.; LJUBENKOV, I.; PISKERNIK, S.; PEZO, I.; TERPINC, P.; BOBAN, M. Polyphenolic profile, antioxidant properties and antimicrobial activity of grape skin extracts of 14 *Vitis vinifera* varieties grown in Dalmatia (Croatia). **Food Chemistry**, v. 119, p. 715–723, 2010.

KOBAYASHI, H.; SAITO, H.; KAKEGAWA, T. Bacterial strategies to inhabit acidic environments. The **Journal of General and Applied Microbiology**, v. 46, p. 235–43, 2000.

LAFKA, T.; SINANOGLU, V.; LAZOS, E. S. On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1206-1214, 2007.

LIU, M.; SEIDEL, V.; KATERERE, D. R.; GRAY, A. I. Colorimetric broth microdilution method for the antifungal screening of plant extracts against yeasts. **Methods**, v. 42, p. 325–329, 2007.

LOMOLINO, G.; ZOCCA, F.; SPETTOLI, P.; ZANIN, G.; LANTE, A. A preliminary study on changes in phenolic content during Bianchetta Trevigiana winemaking. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, p. 575–579, 2010.

MESSIAS, C. IAC e Unicamp buscam uva e vinho representativos de SP. **Jornal de UNICAMP**, Campinas, 12-25, Nov. 2007.

MØRETRØ, T.; DAESCHEL, M. Wine is bactericidal to foodborne pathogens. **Journal of Food Science**, v. 69, p. 251–257, 2004.

MOURE, A. S.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUES, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUES, H.; NÚNES, M. J.; PARAJ', J. C. Review - Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145-171, 2001.

PAPADOPOULOU, C.; SOULTI, K.; ROUSSIS, I. G. Potential antimicrobial activity of red and white wine phenolic extracts against strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. **Food Technology and Biotechnology**, v. 43, n. 1, p. 41–46, 2005.

PESCHEL, W.; SANCHES-RABENDA, F.; DIEKMANN, W.; PLESCHER, A.; GARTZIA, I.; JIMENEZ, D. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetables and fruit wastes. **Food Chemistry**, v. 97, p. 137–150, 2006.

PRIERUR, C.; RIGAUD, J.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Oligomeric and polymeric procyanidins from grape seeds. **Phytochemistry**, v. 36, p. 781–784, 1994.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001

RIZZON, L. A., MIELE, A., MENEGUZZO, J. Efeito da relação das fases líquida e sólida da uva na composição química e na característica sensorial do vinho Cabernet. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, n. 3, 1999.

ROTAVA, R.; ZANELLA, I.; SILVA, L. P. da; MANFRON, M. P.; CERON, C. S.; ALVES, S. H.; KARKOW, A. K.; SANTOS, J. P. A. Atividade antibacteriana, antioxidante e tanante de subprodutos da uva. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 941-944, 2009.

ROUSSIS, I. G.; LAMBROPOULOS, I.; TZIMAS, P.; GKOULIOTI, A.; MARINOS, V.; TSOUPEIS, D.; BOUTARIS, I. Antioxidant activities of some Greek wines and wine phenolic extracts. **Journal of Food Composition and Analysis** (2008), doi:10.1016/j.jfca.2008.02.011.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v. 112, p. 654–658, 2009.

SERRA, A. T.; MATIAS, A. A.; NUNES, A. V. M.; LEITAO, M. C.; BRITO, D.; BRONZE, R., SILVA, S.; PIRES, A.; CRESPO, M. T.; ROMÃO, M. V. S.; DUARTE, C. M. In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, p. 311–319, 2008.

SINGLETON, V. L.; ROSSI Jr, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 26, n. 2, p.62-69, 1965.

SIPGNO, G.; TRAMELLI, L.; FAVERI, D. M de. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **Journal of Food Engineering**, v. 81, p. 200–208, 2007.

SOUZA, A. V.; LIMA, G. P. P.; VIETES, R. L. Avaliação nutricional de diferentes variedades de uva (*Vitis* sp). **Naturalia**, v.33, p. 100-109, 2010.

SOVAK, M. D. M. Grape Extract, Resveratrol, and Its Analogs: A Review. **Journal of medical food**, v. 4, n. 2, p. 93-105, 2001.

TAGURI, T.; TANAKA, T.; KOUNO, I. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.27, n.12, p.1965-1969, 2004.

TERRA, M. M.; PIRES, E. J. P.; PETTINELLI JR., A.; POMMER, C. V.; SABINO, J. C.; PASSOS, I. R. S.; COELHO, S. M. B. M.; SILVA, A. C. P da; RIBEIRO, J. A. Produtividade de cultivares IAC de uvas para vinho como produtores diretos e sobre diferentes porta-enxertos. **Bragantia**, Campinas, v. 49, n. 2, p. 345-362, 1990.

ULJAS, H.; INGHAM, S. C. Combinations of intervention treatments resulting in 5-log₁₀-unit reductions in numbers of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* DT104 organisms in apple cider. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 1924–1929, 1999.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; NADRA, M. C. M. Influence of phenolic compounds from wines on the growth of *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 587–593, 2007a.

VAQUERO, M. J. R.; ALBERTO, M. R.; NADRA, M.C. M. Antibacterial effect of phenolic compounds from different wines. **Food Control**, v. 18, p. 93–101, 2007b.

WAITE, J.G.; DAESCHEL, M. A. Contribution of wine components to inactivation of food-borne pathogens. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 7, p. M286-M291, 2007.

XIA, E.; DENG, G.; GUO, Y.; LI, H. Review: Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 622-646, 2010.

YILMAZ, Y.; TOLEDO, R. T. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry by products and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 41-48, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

- Etapas da vinificação da uva Máximo IAC 138-22 foram analisadas neste trabalho e não houve diferença significativa entre o conteúdo de fenólicos totais extraídos com as soluções extratoras etanol:água 1:1 (v/v) e acetona:água 1:1 (v/v) para a maioria das amostras;
- Amostras com elevadas quantidades de compostos fenólicos totais (sementes, resíduos e casca da uva Máximo IAC 138-22) apresentaram atividades antioxidante e antimicrobiana significativas;
- Os resíduos da vinificação da uva Máximo IAC 138-22 podem ser reaproveitados visto que os extratos obtidos apresentaram quantidades elevadas de fenólicos, atividade antioxidante moderada e atividade antimicrobiana contra bactérias Gram (+) e Gram (-) e levedura *C. albicans*.
- Sementes de uva Máximo apresentam elevado teor de fenólicos totais, forte atividade antioxidante e valores baixos de MIC contra Gram (+), Gram (-) e levedura *Candida* sp.
- O consumo de vinho Máximo pode ser benéfico para a saúde dos consumidores visto que apresentam capacidade de capturar radicais livres e atividade contra micro-organismos Gram (+), Gram (-) e anti-*Candida*, ambas *in vitro*.

PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Identificação, quantificação e isolamento dos compostos fenólicos majoritários presentes em cada extrato;
- Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana *in vitro* dos compostos isolados;
- Avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes principalmente na uva Máximo IAC 138-22 e no vinho Máximo, amostras dentre as avaliadas que são diretamente consumidas;
- Avaliação das atividades antioxidante e antimicrobiana *in vivo* e o efeito de seu consumo em humanos;
- Aplicação dos extratos com atividades antioxidante e antimicrobiana em alimentos para avaliar o tempo de prateleira e análise sensorial;
- Alteração no processamento do vinho Máximo visando à obtenção de teor de fenólicos sem prejuízo para as características organolépticas;
- Estudos de aplicação dos extratos dos resíduos obtidos na vinificação da uva Máximo IAC 138-22.

ANEXOS

Anexo I: Propriedade rural com plantio de uva Máximo IAC 138-22



Foto da propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP, onde as amostras de uva Máximo IAC 138-22 analisadas neste trabalho foram obtidas.

Anexo II: Uva Máximo IAC 138-22



Foto obtida em 15 de maio de 2011 de uva Máximo IAC 138-22 cultivada na propriedade rural localizada na cidade de Itatiba/SP.

Anexo III: Produção de vinho Máximo.



Foto da propriedade localizada na cidade de Valinhos/SP onde foi realizada a vinificação do vinho Máximo, sendo obtidas as amostras de mosto inicial, mosto intermediário, mosto final, resíduos e vinho.